

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Testování antioxidační aktivity pomocí luminolového  
chemiluminiscenčního systému**

**Testing antioxidant activity using luminol  
chemiluminescence system**

**Vedoucí diplomové práce:** doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

**Konzultant:** doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

**Hradec Králové, 2015**

**Gabriela Chládková**

## **Poděkování**

Ráda bych především poděkovala vedoucí své diplomové práce doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za pomoc a poradenství při vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala celé své rodině a svému okolí za trpělivost po celou dobu studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 7.5.2015

# OBSAH

ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM ZKRATEK .....	9
1. ÚVOD.....	11
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	12
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	13
3.1 Sekvenční injekční analýza .....	13
3.1.1 Obecná charakteristika SIA.....	13
3.1.2 Princip metody SIA.....	13
3.2 Antioxidační aktivita.....	13
3.3 Metody stanovení antioxidační aktivity .....	14
3.3.1 LDL oxidace.....	14
3.3.2 Analýza TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter).....	15
3.3.3 ORAC (oxygen radical absorbance capacity) .....	15
3.3.4 ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonát) .....	16
3.3.5 TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) .....	16
3.3.6 CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity).....	17
3.3.7 Analýza DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl).....	17
3.3.8 Analýza FRAP (ferric reducing antioxidant power) .....	18
3.3.9 Analýza DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylendiamine).....	18
3.3.10 ESR (electron spin resonance) .....	18
3.3.11 Hodnocení redoxního potenciálu .....	19
3.3.12 Chemiluminiscence .....	19
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	20
4.1 Materiál .....	20
4.1.1 Chemikálie .....	20
4.1.2 Laboratorní přístroje.....	20
4.2 Pracovní postup.....	21

4.2.1	Příprava roztoků .....	21
4.2.2	Nastavení systému SIA .....	22
4.2.3	Měření vzorků .....	23
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	25
5.1	Resveratrol .....	25
5.1.1	Podmínky měření č. 1 .....	25
5.1.2	Podmínky měření č. 2 .....	28
5.1.3	Podmínky měření č. 3 .....	30
5.1.4	Podmínky měření č. 4 .....	32
5.1.5	Podmínky měření č. 5 .....	33
5.2	Kyselina p-kumarová .....	36
5.2.1	Podmínky měření č. 1 .....	36
5.2.2	Podmínky měření č. 2 .....	39
5.2.3	Podmínky měření č. 3 .....	41
5.2.4	Podmínky měření č. 4 .....	43
5.2.5	Podmínky měření č. 5 .....	43
5.3	Trolox .....	45
5.3.1	Podmínky měření č. 1 .....	46
5.3.2	Podmínky měření č. 2 .....	48
5.3.3	Podmínky měření č. 3 .....	50
5.3.4	Podmínky měření č. 4 .....	52
5.3.5	Podmínky měření č. 5 .....	52
6.	SOUHRN .....	54
7.	ZÁVĚR .....	58
	POUŽITÁ LITERATURA .....	59

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Gabriela Chládková

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, Csc.

Název diplomové práce: Testování antioxidační aktivity pomocí luminolového chemiluminiscenčního systému

Úkolem této diplomové práce bylo porovnání různých podmínek pro testování antioxidační aktivity pomocí luminolového chemiluminiscenčního systému v průtokovém systému a zhodnocení závislosti antioxidační účinnosti na koncentraci. Antioxidační účinnost byla popisována jako závislost zhášení chemiluminiscenčního signálu na použité koncentraci antioxidantu. Byla pozorována antioxidační účinnost tří látek – resveratrol, kyselina p-kumarová a trolox. Trolox se používá jako standard při hodnocení antioxidační aktivity.

Chemiluminiscenční systém byl tvořen chemiluminiscenčním činidlem, zde byl použit luminol v roztoku hydroxidu sodného popř. v roztoku uhličitanu sodného s úpravou pH na 10, nebo bez úpravy. Luminol vykazoval chemiluminiscenční záření následně po oxidaci peroxidem vodíku v přítomnosti katalyzátorů. Jako katalyzátor zde byl použit hexakynoželezitan draselný popř. hexakynoželezitan draselný. Během měření bylo nastaveno pracovní napětí 435 mV popř. 750 mV. Celá analýza probíhala v systému sekvenční injekční analýzy (SIA), která umožnila automatizaci, vysokou opakovatelnost a zrychlení celého měření. Snímání signálu bylo nastaveno na 60 s při využití zastaveného toku, kdy dochází k reakci, tedy ke zhášení chemiluminiscence. U získaných píků byly pozorovány hodnoty výšek a ploch pod píkem.

Byla pozorována antioxidační aktivita resveratrolu, kyseliny p-kumarové a troloxu, a to v rozsahu koncentrací  $2,44 \times 10^{-7}$  až  $1 \times 10^{-3}$  mol/l za 5 různých podmínek měření. Jako nejvhodnější pro měření se jeví využití roztoku peroxidu vodíku o koncentraci  $10^{-4}$  mol/l, roztoku hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, roztoku luminolu o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l v roztoku 0,1 M hydroxidu sodného.

Nejsilnějším antioxidantem ze tří pozorovaných látek byl resveratrol, o něco slabší antioxidační aktivitu vykazoval trolox a jako nejslabší antioxidant se jeví kyselina p-kumarová.

# ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Gabriela Chládková

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Consultant: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, Csc.

Title of Diploma Thesis: Testing antioxidant activity using luminol chemiluminescence systém

The aim of the thesis was to compare various conditions for the testing of the antioxidant activity by means of the luminol chemiluminescent system in the flow system, and evaluation of dependence of the antioxidant efficacy on concentration. The antioxidant efficacy was described as dependency of the decrease of a chemiluminescence signal on the used concentration of an antioxidant. Efficacy of three substances – resveratrol, p-coumaric acid and trolox was observed. Trolox was used as a standard substance in evaluation of the antioxidant activity.

The chemiluminescence system was based on a chemiluminescent reagent. In this particular case we used luminol in a sodium hydroxide solution or in a sodium carbonate solution adjusted to pH 10 or without pH adjustment. Luminol demonstrated chemiluminescence emission after oxidation with hydrogen peroxide in the presence of catalysts. As the catalyst, potassium hexacyanoferrate(III) or potassium hexacyanoferrate(II) were used. The working voltage was set to 435 mV or to 750 mV during the measurement. The whole analysis was carried out in the sequential injection analysis (SIA) system that enables automation, high repeatability and the speeding up of the whole measuring process. The signal scanning was set to 60 seconds with the use of a stop-flow when the decrease of chemiluminescence occurs. Values of heights and peak areas were observed.

The antioxidant activity of resveratrol, p-coumaric acid and trolox with concentrations ranging from  $2.44 \times 10^{-7}$  up to  $1 \times 10^{-3}$  mol/l were observed under five different conditions of the measurement. The use of a hydrogen peroxide solution with the concentration of  $10^{-4}$  mol/l, a potassium hexacyanoferrate(III) solution with the concentration of  $10^{-3}$  mol/l, and a luminol solution with the concentration of  $10^{-3}$  mol/l in a 0.1 M a sodium hydroxide solution appeared to be the most suitable.

Out of the three observed substances, resveratrol was the strongest antioxidant, trolox demonstrated a slightly weaker antioxidant activity and p-coumaric acid appeared to be the weakest antioxidant.



## SEZNAM ZKRATEK

- AAPH - 2,2'-azobis(2-methylpropionamidin)dihydrochlorid  
ABAP - 2,2'-diazobis(2-methylpropionamidin)dihydrochlorid  
ABTS - 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonát)  
AUC - plocha pod píkem, (area under the curve),  
CL – chemiluminiscence  
CL<sub>B</sub> – chemiluminiscence slepého signálu  
CL<sub>K</sub> – chemiluminiscence kyseliny p-kumarové  
CL<sub>R</sub> – chemiluminiscence resveratrolu  
CL<sub>T</sub> – chemiluminiscence troloxu  
CL<sub>V</sub> – chemiluminiscence vzorku  
CUPRAC – snížení antioxidační kapacity pomocí měďnatých iontů, (cupric reducing antioxidant capacity)  
DPPH - 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl  
ET – elektronový přenos, (electron transfer)  
ESR - elektronová spinová rezonance, (elektron spin resonance)  
FRAP – snížení antioxidační kapacity pomocí železitých iontů, (ferric reducing antioxidant power)  
HAT- přesun vodíkového atomu, (hydrogen atom transfer)  
HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie, (high-performance liquid chromatography)  
LDL – lipoproteiny o nízké hustotě, (low-density lipoprotein)  
NO• - radikál oxidu dusnatého  
NO<sub>2</sub>• - radikál oxidu dusičitého  
O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> - superoxid  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - singletový kyslík  
•OH - hydroxylový radikál  
ONOO<sup>-</sup> - peroxyinitrit  
ORAC – kapacita pohlcovat kyslíkové radikály (oxygen radical absorption capacity)  
RNS - reaktivní dusíkové formy  
RO• - alkoxylový radikál  
ROO• - peroxylový radikál  
ROONO<sup>-</sup> - alkylperoxyinitrit  
ROS - reaktivní formy kyslíku  
SIA - sekvenční injekční analýza

TEAC – troloxu ekvivalentní antioxidační kapacita (trolox equivalent antioxidant capacity)

TRAP – antioxidační parametr popisující celkový záchyt radikálů (total radical-trapping antioxidant parameter)

# 1. ÚVOD

Antioxidanty jsou nezbytnou složkou lidské stravy, chrání lidský organismus před oxidativním stresem vychytáváním volných radikálů. Pro hodnocení antioxidační aktivity existuje nespočet metod. Základní dělení metod stanovení antioxidační aktivity je dělení na metody fyzikální a metody chemické. Metody chemické se dále rozlišují na základě typu probíhající reakce, zda dochází k přesunu atomu vodíku nebo k přesunu elektronu<sup>5</sup>. V této diplomové práci byl pro hodnocení antioxidační aktivity použit luminolový chemiluminiscenční systém v průtokovém systému založeném na sekvenční injekční analýze (SIA).

## 2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo nalezení nejvhodnějších podmínek pro stanovení antioxidační aktivity pomocí luminolového chemiluminiscenčního systému a zhodnocení antioxidační síly vybraných látek. Byla hodnocena antioxidační aktivita resveratrolu, kyseliny p-kumarové a troloxu. Chemiluminiscenční aktivita byla hodnocena pomocí systému sekvenční injekční analýzy. Antioxidační účinnost byla hodnocena jako závislost mezi zhášením chemiluminiscenčního signálu a použité koncentraci antioxidantu.

V teoretické části bylo cílem nastínit důležitost antioxidantů, jejich roli v organismu a princip účinku. Dále pak shrnout princip metody SIA a popsat její uspořádání. Hlavním úkolem však byl popis používaných metod ke stanovení antioxidační aktivity dle odborné literatury.

# TEORETICKÁ ČÁST

## *2.1 Sekvenční injekční analýza*

### **2.1.1 Obecná charakteristika SIA**

Sekvenční injekční analýza (SIA) se řadí mezi průtokové analytické metody, díky kterým lze stanovovat velké množství vzorků v určitém čase. Touto metodou je zajištěno automatizované dávkování činidel a vzorků pomocí ovládacího programu z počítače. To zvyšuje rychlost stanovení a umožňuje dodržet dostatečnou opakovatelnost<sup>1</sup>.

### **2.1.2 Princip metody SIA**

Připravený roztok vzorku obsahuje stanovovanou látku, kterou je zapotřebí vhodnou chemickou reakcí převést na produkt, u kterého lze stanovit určitou analytickou vlastnost. Celý systém SIA se skládá z pístového čerpadla, mísící cívky, vícecestného selekčního ventilu, detekční cely, detektoru a počítače. Nosný proud, činidla a vzorek jsou aspirovány pomocí pístového čerpadla přes selekční ventil. Jednotlivé aspirované zóny mohou být od sebe odděleny vzduchovou bublinou, a pak začínají reagovat až v detekční cele. V běžném uspořádání jednotlivé segmenty od sebe odděleny nejsou, aby mohlo dojít ihned k disperzi a tím k zamýšlené chemické reakci. Poté jsou reagenty pomocí zpětného chodu čerpadla smísena a vhodnou chemickou reakcí vzniká produkt, jenž je dopraven do detektoru. Probíhající chemická reakce obvykle nedosahuje rovnováhy a rychlé měření je zajištěno díky opakovatelnosti časování jednotlivých kroků měření. Výsledkem je signál v podobě píku<sup>1</sup>.

## *2.2 Antioxidační aktivita*

Antioxidanty jsou látky inhibující oxidační aktivitu a tím zabraňují nebo alespoň snižují destrukci buněk. Chrání tak lidský organismus před oxidačním stresem způsobeným volnými radikály. Většinu antioxidantů přijímá lidské tělo prostřednictvím potravy, kde hlavními zdroji jsou nejrůznější druhy ovoce a zeleniny, víno, chmel, čaj, léčivé byliny atd.<sup>2</sup>.

Oxidativním stresem vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní dusíkové formy (RNS). Ty pak působí toxicky na tuky, bílkoviny a DNA, pozměňují tak stavbu

molekul, orgánů i organismů a tím pádem mají vliv i na jejich funkci<sup>3</sup>. Antioxidantům je přisuzována schopnost oddálení či dokonce zabránění některým nemocím, jako jsou neurodegenerativní onemocnění – jako je Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba, kardiovaskulární onemocnění nebo rakovina<sup>4</sup>.

ROS existují v několika podobách, jako je anion superoxidu ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxylový radikál ( $\bullet OH$ ), peroxylový radikál ( $ROO\bullet$ ), alkoxylový radikál ( $RO\bullet$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a singletový kyslík ( $^1O_2$ ). RNS se vyskytují v těchto podobách: oxid dusnatý ( $NO\bullet$ ), oxid dusičitý ( $NO_2\bullet$ ), peroxyinitrit ( $ONOO^-$ ) a alkylperoxyinitrit ( $ROONO^-$ )<sup>5</sup>.

Existuje mnoho metod pro hodnocení antioxidační kapacity, avšak výsledky z různých testů nejsou srovnatelné. Mohou ale poskytnout představu o ochranném potenciálu přítomných antioxidantů. Pro adekvátní posouzení antioxidační kapacity je vysoce doporučeno použít více než jednu metodu pro hodnocení antioxidační aktivity<sup>5</sup>.

### ***2.3 Metody stanovení antioxidační aktivity***

Základní dělení metod stanovení antioxidační aktivity je dělení na metody fyzikální a metody chemické. Mezi metody fyzikální patří chemiluminiscence (CL), elektronová spinová rezonance nebo hodnocení redoxního potenciálu. Metody chemické se rozdělují do dvou skupin podle typu probíhající reakce:

- a) HAT (hydrogen atom transfer)- testy založené na přesunu atomu vodíku
- b) ET (electron transfer) – testy založené na přesunu elektronu<sup>5</sup>

Testy HAT zahrnují tyto metody hodnocení antioxidační aktivity: LDL oxidace, ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter). HAT testy jsou založené na měření schopnosti antioxidantu zhaset volné radikály pomocí H-atomu<sup>5</sup>.

Testy ET zahrnují metody ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazole-6-sulphonate), CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity), DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power), TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) a DMPD (N,N-dimethyl-p-phenyldiamine). V případě ET testů dochází k redukcí oxidantů ve vzorcích a následně ke změně zbarvení, která se hodnotí spektrofotometricky<sup>5</sup>.

#### **2.3.1 LDL oxidace**

AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)hydrochlorid) je generátorem peroxylových radikálů, následná peroxidace je hodnocena spektrofotometricky při 234 nm. AAPH peroxylové radikály oxidují lipidy především v buněčných membránách a

generují tak lipidové peroxidy. Tato metoda tedy patří do skupiny metod, které hodnotí eliminaci lipidové peroxidace. Jedná se tedy o metody zkoumající vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci. AAPH se používá ke stanovení antioxidantů, které ovlivňují peroxidaci kyseliny linolové (nejčastěji)<sup>3</sup>.

### **2.3.2 Analýza TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter)**

Analýza TRAP používá ke generování peroxylových radikálů ABAP, což je 2,2'-diazobis(2-amidinopropan)hydrochlorid<sup>6</sup>. Tato metoda sleduje ovlivnění fluorescence prostřednictvím přítomných antioxidantů a volných radikálů. Fluorescenční molekulou může být např. fykoerythrin, jeho fluorescence je zhasena přítomností peroxylových radikálů ABAP. Avšak v přítomnosti antioxidantů jsou spuštěny oxidační reakce a tím antioxidanty zabraňují zhasení fluorescence<sup>7</sup>.

### **2.3.3 ORAC (oxygen radical absorption capacity)**

Tato metoda je založená na hodnocení degradace fluorescenční molekuly po styku s generátory radikálů, dochází k poškození fluorescenční molekuly a tím ke ztrátě fluorescence. Právě antioxidanty chrání molekuly před tímto působením radikálů na fluorescenční molekuly. Stupeň ochrany se hodnotí pomocí fluorimetru. Degenerace fluorescenční molekuly se tedy měří jako přítomnost antioxidantu, čím méně antioxidantu, tím vyšší rozklad fluorescenční molekuly a tím vyšší úbytek fluorescence<sup>8</sup>.

Při hodnocení antioxidační aktivity se sleduje intenzita fluorescence v závislosti na čase. Jako standard pro hodnocení se používá trolox, kdy se různé koncentrace používají k získání křivky závislosti intenzity fluorescence na čase a testované vzorky jsou pak porovnávány v těchto oblastech. Kvantifikace ORAC testů je tedy na základě hodnocení plochy pod píkem (AUC)<sup>8</sup>. Úbytek fluorescence se pozoruje např. na  $\beta$ -fykoerythrinu nebo na fluoresceinu. Původně byl test vyvinut za použití fluorescenčního proteinu  $\beta$ -fykoerythrinu, avšak kvůli nestálosti reagentu, citlivosti na světlo a vazbě na polyfenoly byl  $\beta$ -fykoerythrin nahrazen v praxi fluoresceinem<sup>5</sup>.

Jako generátor radikálů se používá 2,2'-azobis(isobutyrimidamid)dihydrochlorid (AAPH), takto jsou generovány peroxidové radikály při zahřívání a při přítomnosti dostatečného množství kyslíku. Pro generování hydroxylových radikálů se používá  $H_2O_2 + Cu^{2+}$ . Šíře využití je vyšší v případě fluorescenčního systému s použitím fluoresceinu a to v podobě fluorescenční sondy<sup>3</sup>.

Při hodnocení naměřených výsledků se AUC (area under the curve) vzorků porovnávají s AUC standardu, tedy troloxu, u kterého jsou známé koncentrace. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) je hydrofilní syntetický analog vitamínu E<sup>5</sup>.

Výhodou této metody je, že hodnotí i antioxidační kapacitu, která se projevuje se zpožděním. Obsahuje-li vzorek komplex antioxidantů, jejichž začátek působení antioxidační aktivity je pomalejší<sup>9</sup>.

K ovlivnění měření antioxidační kapacity se používají cyklodextriny, především mají využití v metodě ORAC při stanovování antioxidantů, které mají podobu fenolických sloučenin. Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy se šesti až osmi glukopyranozovými jednotkami, kdy vnější část CD je hydrofilní a vnitřní dutina hydrofobní. Do dutiny CD je pak začleněna molekula antioxidantu a vytváří tak komplex. Nativní cyklodextriny mohou být chemicky upraveny a to tak, aby byla zlepšena jejich rozpustnost a nebo hydrofilní/hydrofobní vlastnosti. Komplexy s cyklodextriny mohou zlepšovat vlastnosti antioxidantů, jako jsou například rozpustnost ve vodě, biologická dostupnost, stabilita a antioxidační účinnost celého komplexu<sup>10</sup>.

Metoda ORAC je standardizovaná, nebývá finančně náročná, ale nevýhodou je pH citlivost a dlouhá doba potřebná ke kvantifikaci výsledků<sup>11</sup>.

### **2.3.4 ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonát)**

Stanovení antioxidační aktivity analýzou ABTS je založeno na vychytávání radikálového kationtu ABTS (ABTS•+) přítomnými antioxidanty ve stanovovaném vzorku. Radikálový kationt ABTS má přirozeně modrozelenou barvu s maximální absorpčními pásy při 645 nm, 734 nm a 815 nm<sup>11</sup>. ABTS•+ se připravuje reakcí s oxidem manganičitým, respektive se ABTS filtruje přes prášek MnO<sub>2</sub>. Přebytek MnO<sub>2</sub> se odstraní filtrací přes mikrofiltr. Další možností přípravy ABTS•+ je např. reakce s persíranem draselným K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>7</sup>.

Nespornou výhodou ABTS•+ je, že jeho koncentrované roztoky vydrží i měsíce v chladničce, v době potřeby se jen tyto koncentrované roztoky naředí na potřebnou koncentraci odpovídající potřebné absorpční<sup>5</sup>. Po styku tohoto radikálu s antioxidantem v reakčním prostředí dojde k zachycení volných radikálů a tím se změní zbarvení (vzniká světle zelené zbarvení nebo až úplné odbarvení) a dojde ke snížení absorbance. Pokles absorbance kvantitativně odpovídá koncentraci přítomných antioxidantů. Tato metoda je rychlá, jednoduchá na provedení, finančně nenáročná a uskutečnitelná při širokém rozmezí pH<sup>11</sup>.

### **2.3.5 TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)**

Metoda TEAC velmi úzce souvisí s předcházející metodou ABTS, metoda ABTS bývá také označována jako metoda TEAC. Protože schopnost inhibovat radikál



ABTS, což vyjadřuje antioxidační aktivitu vzorku, se porovnává s antioxidační aktivitou referenčního standardu, tedy troloxu<sup>11</sup>.

Hodnota TEAC je formulována jako milimolární (mmol) koncentrace troloxu, která odpovídá antioxidační aktivitě zkoušené látky o koncentraci 1 mmol/l<sup>11</sup>.

### **2.3.6 CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity)**

Metoda CUPRAC je jednou z metod, které jsou založené na bázi přenosu elektronů. Jako chromogenní oxidační činidlo se zde používá komplex neokuproinu s měďnatými ionty (Cu(II)-Nc). Ke vzorku, který obsahuje antioxidant, se přidají jako reakční činidla chlorid měďnatý, octan amonný a již zmiňovaný neokuproin. Reakce probíhá při pH 7 po dobu 30 min (nejčastěji). Např. reakce CUPRAC činidla s kyselinou askorbovou: (Cu(II)–Nc) se redukuje na vysoce barevný chelát (Cu(I)–Nc) a kyselina askorbová se oxiduje na dehydroaskorbovou kyselinu<sup>12</sup>. Výsledný produkt redoxní reakce je CUPRAC chromofor, u kterého se posuzuje spektrofotometricky absorbance při 450 nm. Výsledné zbarvení je oranžovo-žluté. Jedná se tedy o metodu, která využívá měďnatý iont ke snížení antioxidačních schopností. Použitá činidla jsou cenově dostupná a poměrně stabilní<sup>13</sup>.

Výhodné je u metody CUPRAC propojení se systémem HPLC, vzniká tak on-line metoda HPLC-CUPRAC. Toto propojení kombinuje chromatografickou separaci, analýzu a konečnou identifikaci antioxidantů. Tato metoda je rychlá, univerzální, levná, činidla jsou stabilní a umožňuje on-line kvalitativní a kvantitativní stanovení antioxidačních složek komplexních vzorků. Lze takto stanovit celkovou antioxidační aktivitu, ale i antioxidační aktivitu jedné složky z celého komplexu<sup>5</sup>.

### **2.3.7 Analýza DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl)**

Tato metoda je založena na reakci difenylpicrylhydrazylu - DPPH s antioxidantem. Radikál DPPH je redukován přítomným antioxidantem a dochází tak ke změně zbarvení vzorku, purpurově zbarvený vzorek je odbarven. Změna barevnosti a rychlost této změny je úměrná antioxidační aktivitě stanovované látky<sup>14</sup>. V podstatě je antioxidační aktivita vzorku vyjádřena jako ekvivalentní koncentrace ke standardnímu antioxidantu, který se stejnou účinností umožňuje zhasení stabilního DPPH radikálu. Jako standard se používá trolox a nebo kyselina askorbová<sup>15</sup>.

DPPH krystaly se rozpustí v methanolu nebo ethanolu, zaznamená se počáteční absorbance DPPH•, směs se inkubuje po dobu 30 min spolu se vzorkem antioxidantu a změří se konečná absorbance. Vyhodnocení této metody je možné hned několika způsoby. Jednou z variant je spektrofotometrické proměření, kdy se sleduje pokles absorbance při 515 nm. Antioxidační aktivita je hodnocena nejčastěji jako IC50, což je antioxidační koncentrace potřebná ke snížení DPPH absorbance o polovinu, nebo se

hodnotí jako procentuální ztráty originální absorbance DPPH<sup>5</sup>. Další variantou pro hodnocení této metody je spinová elektronová rezonance nebo HPLC detekce<sup>3</sup>.

Jako velmi výhodné se jeví spojení metody DPPH spolu se systémem SIA a následnou spektrofotometrickou detekcí. Díky své rychlosti a citlivosti je metoda SIA vhodná pro provádění rutinních screeningových testů na přítomnost antioxidantů. Lze takto stavovat velké série vzorků a to i v případě přírodních substancí, jako jsou lyofilizované extrakty bylin a hub. Výhodou je i to, že je zapotřebí jen několik miligramů vzorku. Samotná metoda DPPH není příliš vhodná pro hodnocení velkého množství vzorku, jelikož standardní reakční doba je až 30 minut. V případě propojení DPPH metody s HPLC dochází nejdříve k separaci vzorku pomocí HPLC, pak následuje za kolonou on-line detekce antioxidantů metodou DPPH, kde analýza jednoho rostlinného vzorku trvá dalších 30 minut. Právě kvůli časové náročnosti není propojení s HPLC příliš vhodné pro provádění rutinních screeningových testů. Oproti tomu SIA-DPPH metoda zajišťuje relativně vysokou produktivitu, opakovatelnost a je vhodná pro rychlé testování antioxidační aktivity<sup>16</sup>.

### **2.3.8 Analýza FRAP (ferric reducing antioxidant power)**

Antioxidační aktivita se v případě metody FRAP hodnotí podle redukčních schopností, kdy dochází k redukci železitých iontů na ionty železnaté. Dochází k redukci železitých iontů s tripyridyltriazinovým komplexem (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) při nízkém pH, kdy proběhne barevná reakce. Železité komplexy jsou bezbarvé a po uskutečnění redukce získávají fialové zbarvení. FRAP hodnoty se pak získávají proměřením absorbance při 593 nm a tyto naměřené hodnoty se porovnávají s absorbancí směsí o známých koncentracích. Test FRAP je levný, reakční činidla jsou snadno připravitelná, výsledky jsou vysoce reprodukovatelné, postup je jednoduchý a rychlý<sup>17</sup>.

### **2.3.9 Analýza DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylendiamine)**

Metoda DMPD používá N,N-dimethyl-p-fenylendiamin v roztoku, z kterého se pomocí chloridu železitého získá červenofialová radikálová forma. Po styku s antioxidanty ve vzorku dochází ke zhášení radikálů a tím dochází ke ztrátě barevnosti. Výsledky se posuzují spektrofotometricky, kdy se absorbance proměřuje při 505 nm, a srovnávají se standardizovaným troloxem. Nevýhodou je nižší časová stabilita DMPD a snížené pH (5,25)<sup>18</sup>.

### **2.3.10 ESR (electron spin resonance)**

Elektronová spinová rezonance (ESR) je metoda vhodná pro stanovení iontů obsahujících volný elektron. Tento test je založen na měření přechodů nepárových

elektronů v magnetickém poli směrem k molekulám, které mají nepárové elektrony, tedy volné radikály. ESR je využívána pro detekci radikálů proteinů a peptidů. Výhodou ESR je citlivost, jednoduchost a přesnost. Vysoká citlivost ESR umožňuje i detekci nízké koncentrace radikálů<sup>19</sup>.

### 2.3.11 Hodnocení redoxního potenciálu

V praxi se odstoupilo od původního kolorimetrického hodnocení redox potenciálu a přešlo se na elektrochemické hodnocení. To znamená, že se redoxní potenciál posuzuje ve vztahu k vodíkové elektrodě. Ani tato vylepšená metoda nepřinesla velké využití. Pro toto hodnocení je důležité rozdělení do 3 tříd a to: rozpuštěný kyslík, těžké kovy a látky povahy reduktonů. Tyto 3 třídy mají majoritní vliv na redoxní potenciál, avšak i jiné látky, které jsou elektrochemicky neaktivní, mohou ovlivňovat redox potenciál. Toto hodnocení není vhodné pro hodnocení antioxidační aktivity<sup>8</sup>.

### 2.3.12 Chemiluminescence

Chemiluminiscenci se rozumí generování elektromagnetického záření, kdy dochází k převedení energie chemické na energii světelnou. Přičemž světlo může být emitováno v ultrafialové, viditelné, nebo v infračervené oblasti. Nejběžnější je emise světla ve viditelné oblasti<sup>20</sup>. Proběhlou chemickou reakcí vzniká produkt, který se dostává do excitovaného stavu a při přechodu zpět na základní energetický stav se přebytečná energie vyzáří v podobě fotonů. Chemiluminescence bývá často nazývána jako světélkování<sup>21</sup>.

#### 2.3.12.1 PCL (*Photochemoluminescence*)

Metoda PCL je založená na fotochemickém generování radikálů v kombinaci s citlivou chemiluminiscenční detekcí<sup>7</sup>.

PCL test využívá při hodnocení antioxidační aktivity přístroj zvaný Photochem sloužící ke generování peroxidových radikálů, které jsou pak spotřebovány při kontaktu s antioxidantem ve vzorku. Ty radikály, které nebyly spotřebovány antioxidanty, reagují s luminolem a umožňují tak detekci. Poté, co jsou antioxidanty spotřebovány, zvyšuje se hladina přítomných radikálů a tím roste i chemiluminescence<sup>22</sup>.

Pro hydrofilní antioxidanty je přizpůsobená metoda ACW (Antioxidant Capacity of Water soluble substance) a pro hydrofobní antioxidanty ACL (Antioxidant Capacity of Liposoluble substance). V případě antioxidantů rozpustných ve vodě se ACW výsledek hodnotí podle trvání „lag“ fáze. V případě antioxidantů rozpustných v tucích se ACL koncentrace antioxidantů stanovuje dle integrálu pod získanou křivkou. Standardem pro ACW je kyselina askorbová a pro ACL je standardem trolox. PCL metoda je velice citlivá a lze ji použít i při nízkých koncentracích – až nanomoly/L<sup>22</sup>.

## **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Chemikálie**

Resveratrol, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Kyselina p-kumarová, Fluka Chemika, Švýcarsko

Trolox, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Peroxid vodíku 30%, Fluka Chemika, Švýcarsko

Hexakynoželezitan draselný, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Hexakynoželeznan draselný, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Luminol, SERVA, Německo

Hydrogenuhlíčan sodný, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika

Hydroxid sodný, Penta, Chrudim, Česká republika

Hydroxid sodný roztok, použitý k úpravě pH, připravený na Katedře analytické chemie

Demineralizovaná voda, připravená na Katedře analytické chemie

#### **3.1.2 Laboratorní přístroje**

Počítač s nainstalovaným Windows 98, software FaFSIA

Pístové čerpadlo, objem 2,5ml, Cavro XL-3000, USA

Mísící cívka a spojovací hadičky o průměru 0,50mm a 0,75mm z polytetrafluorethylenu

10-cestný selekční ventil, Vici Valco, USA

Chemiluminiscenční cela sestavená na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové

Fotonásobič Hamamatsu, H5784-01, Japonsko

## 3.2 Pracovní postup

### 3.2.1 Příprava roztoků

Zásobní roztoky byly připravovány na začátku experimentu a používány až do úplného spotřebování. Roztok peroxidu vodíku musel být připravován vždy čerstvý z důvodu nestability. Roztoky byly připravovány ve skleněných odměrných baňkách a byly uchovávány v lednici.

Pro zásobní roztok resveratrolu o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l bylo použito 0,0228 g resveratrolu o molekulové hmotnosti 228,24 g/mol a 100 ml methanolu. Tento základní roztok byl dále ředěn demineralizovanou vodou pro vytvoření kalibrační řady postupně v poměru 1:1.

Pro přípravu zásobního roztoku kyseliny p-kumarové o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l bylo použito 0,0164 g kyseliny p-kumarové o molekulové hmotnosti 164,16 g/mol a 100 ml methanolu. Ředění bylo stejné jako v předchozím bodě.

Zásobní roztok Troloxu o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l bylo použito 0,0250 g troloxu o molekulové hmotnosti 250,29 g/mol na 100 ml methanolu.

Zásobní roztok peroxidu vodíku o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l byl připraven odebráním 560  $\mu$ l peroxidu vodíku 30% a doplněním vodou na 50ml, z tohoto roztoku byl odebrán 1ml a doplněn vodou na objem 100 ml. V případě přípravy roztoku peroxidu vodíku o koncentraci  $10^{-4}$  mol/l byl zásobní roztok o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l zředěn 10x.

Zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l byl připraven navážením a rozpuštěním 0,0328 g hexakynoželezitanu draselného ve 100 ml vody.

Zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l byl připraven z 0,0422 g hexakynoželezitanu draselného a ze 100ml vody.

Zásobní roztok luminolu v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l byl připraven rozpuštěním 0,0177 g luminolu ve 100ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $10^{-1}$  mol/l, který byl připraven rozpuštěním 0,4 g hydroxidu sodného ve vodě.

Zásobní roztok luminolu v roztoku hydrogenuhličitanu sodného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l byl připraven rozpuštěním 0,0177 g luminolu ve 100ml roztoku hydrogenuhličitanu sodného, který byl připraven rozpuštěním 2,1003 g hydrogenuhličitanu sodného ve vodě, koncentrace hydrogenuhličitanu sodného byla 0,25 mol/l. U poloviny roztoku bylo pak upravováno pH na hodnotu 10 pomocí koncentrovaného hydroxidu sodného, u druhé poloviny zůstalo pH bez úpravy.

Postup přípravy kalibračních řad.:

Zásobní roztok (resveratrol, kys. p-kumarová, trolox) byl ředěn dle následujícího postupu. První pracovní roztok byl ředěn v poměru 1:1 s vodou do desetimilitrové odměrné baňky, tedy 5 ml zásobního roztoku resveratrolu a 5 ml vody a takto vznikl druhý pracovní roztok. Třetí roztok kalibrační řady byl připraven z druhého roztoku opět v poměru 1:1 s vodou. Tento způsob ředění byl opakován až do vytvoření celé kalibrační řady.

### 3.2.2 Nastavení systému SIA

Celý SIA systém byl sestaven z dvoucestného ventilu, pístového čerpadla, mísící cívky, deseticestného selekčního ventilu, detekční cely, fotonásobiče a počítače.

Před sestavením programu k provedení pokusu byl nejdříve sestaven program na promytí SIA systému. Prvním krokem v programu promytí bylo přepnutí ventilu pístového čerpadla do pozice IN, pak došlo k aspiraci nosného proudu (demineralizovaná voda) o objemu 500  $\mu\text{l}$  rychlostí 50  $\mu\text{l/s}$ . Následovalo přepnutí do pozice OUT a došlo k propojení mezi mísící cívkou a čerpadlem. Rychlostí 30  $\mu\text{l/s}$  bylo aspirováno 100  $\mu\text{l}$  příslušných roztoků z jednotlivých portů (porty 2, 3, 6, 7). Portem č. 5 byly roztoky po promytí odvedeny do odpadní láhve. Před každým použitím nového roztoku byl celý systém takto promyt.

Po promytí následoval program pro měření antioxidační aktivity jednotlivých vzorků. Portem č. 1 byla připojena detekční cely, portem č. 2 byl aspirován peroxid vodíku, portem č. 3 roztok luminolu, port č. 4 nebyl využit, portem č. 5 byl odváděn odpad, portem č. 6 byl aspirován antioxidant a v případě promývání voda, portem č. 7 roztok hexakynoželezitanu popř. hexakynoželeznatanu, portem č. 8 vzduch pro vytvoření bublin pro oddělení aspirovaných roztoků, portem č. 9 došlo k transportu do detekční cely. Jednotlivé roztoky byly v mísící cívce od sebe odděleny vzduchovou bublinou, aby nedošlo k předčasné reakci.

Prvním krokem programu měření bylo přepnutí ventilu pístového čerpadla do polohy IN a došlo k aspiraci 100  $\mu\text{l}$  nosného proudu do mísící cívky rychlostí 50  $\mu\text{l/s}$ . Následovalo přepnutí dvoucestného ventilu do pozice – OUT, dále pak aspirace jednotlivých roztoků a vzduchových bublin. Nejdříve byl aspirován vzduch o objemu 10  $\mu\text{l}$  rychlostí 30  $\mu\text{l/s}$ , rychlostí 30  $\mu\text{l/s}$  byly aspirovány také všechny roztoky. Poté bylo aspirováno 40  $\mu\text{l}$  peroxid vodíku, odděleno vzduchovou bublinou po každé aspiraci roztoků. Jako další byl aspirován roztok luminolu o objemu 40  $\mu\text{l}$ , následovala aspirace 10  $\mu\text{l}$  roztoku hexakynoželezitanu popř. hexakynoželeznatanu a roztok antioxidantu byl aspirován v zóně o objemu 50  $\mu\text{l}$ . Z mísící cívky byly roztoky přečerpány do detekční cely a bylo nastaveno časování tzv. timer po dobu 60 s, kdy byl sledován pomocí chemiluminiscence antioxidační efekt (pokles signálu v závislosti na poklesu koncentrace peroxidu vodíku) v detekční cele, který byl založen na potlačení chemiluminiscence v přítomnosti antioxidantu. Následovala aspirace 300  $\mu\text{l}$  obsahu

z detekční cely a odvedení do odpadní láhve. Po každém měření v programu následovalo promytí detekční cely dostatečným objemem nosného proudu. Každé měření bylo porovnáváno se slepým pokusem, kdy získaný chemiluminiscenční signál nebyl ovlivněn přítomností antioxidantu.

Jako chemiluminiscenční činidlo zde byl použit luminol, který vykazoval chemiluminiscenční záření následně po oxidaci peroxidem vodíku v přítomnosti katalyzátorů. Jako katalyzátor zde byl použit hexakynoželezitan draselný popř. hexakynoželeznatán draselný.

Chemiluminiscenční aktivita byla sledována pomocí detektoru značky Hamamatsu (fotonásobiče), na kterém bylo nastaveno pracovní napětí. Výsledky, tedy výška a plocha píku, byly odečteny pomocí programu FaF SIA pomocí modulu Peak Detection. Odečtené hodnoty závisely na chemiluminiscenční aktivitě a ta závisela na koncentraci testovaného antioxidantu. Detekční cely byla obalena černým nepropustným materiálem, neboť externí světlo zvyšovalo šum výsledného signálu. Na snímač detektoru dopadalo záření, které procházelo zesilovačem a následně bylo převedeno na napětí. Toto napětí pak bylo měřeno v časové závislosti v podobě píku.

### 3.2.3 Měření vzorků

Při běžném měření bylo nastaveno konstantní napětí 435 mV, u každého vzorku proběhly 3cykly měření a vždy vzorky setrvaly 60 s v detekční cele.

U každého vzorku (resveratrol, kyselina p-kumarová, trolox) byla proměřena kalibrační řada za definovaných podmínek. Kalibrační řada resveratrolu, kyseliny p-kumarové i troloxu byla v rozsahu koncentrací  $2,44 \times 10^{-7}$  až  $1 \times 10^{-3}$  mol/l.

Podmínky měření jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 1 – Shrnutí podmínek měření

	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]</b>	<b>luminol v Θ</b>
<b>podmínky č. 1</b>	10 <sup>-3</sup> mol/l	10 <sup>-3</sup> mol/l	NaOH 10 <sup>-3</sup> mol/l
<b>podmínky č. 2</b>	10 <sup>-4</sup> mol/l	10 <sup>-3</sup> mol/l	NaOH 10 <sup>-3</sup> mol/l
<b>podmínky č. 3</b>	10 <sup>-3</sup> mol/l	10 <sup>-3</sup> mol/l	NaHCO <sub>3</sub> 10 <sup>-3</sup> mol/l s úpravou pH
<b>podmínky č. 4</b>	10 <sup>-3</sup> mol/l	10 <sup>-3</sup> mol/l	NaHCO <sub>3</sub> 10 <sup>-3</sup> mol/l bez úpravy pH
<b>podmínky č. 5</b>	10 <sup>-3</sup> mol/l	10 <sup>-3</sup> mol/l Fe <sup>2+</sup>	NaOH 10 <sup>-3</sup> mol/l

Zásobní roztok luminolu byl připraven za podmínek měření č. 1, 2 a 5 v roztoku 0,1 M hydroxidu sodného. Za podmínek měření č. 3 a 4 byl luminol připraven v roztoku hydrogenuhličitanu sodného, kde v případě podmínek měření č. 3 bylo upraveno pH na 10 pomocí roztoku hydroxidu sodného. Kdy v případě měření č. 1, 2, 3 a 4 bylo pracovní napětí 435 mV a v případě měření č. 5 bylo pracovní napětí 750 mV

Za podmínek měření č. 5 byl místo hexakynoželezitanu draselného použit hexakynoželeznatan draselný o stejné koncentraci a muselo být změněno pracovní napětí na 750 mV.

Jako další varianta měření byly tyto podmínky - zásobní roztok peroxid vodíku o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, roztok luminolu v roztoku uhličitanu sodného bez úpravy pH za zvýšeného napětí. Signál detektoru však nebyl měřitelný, nešlo tedy tyto podmínky v měření použít.

Pokaždé byl nejprve proměřen slepý vzorek bez obsahu antioxidantu, portem č. 6 byla tedy dávkována demineralizovaná voda místo roztoku s antioxidační aktivitou. Poté následoval první člen kalibrační řady o nejvyšší koncentraci až po nejnižší koncentraci antioxidantu. Měření proběhlo nejdříve u resveratrolu, dále pak u kyseliny p-kumarové a v závěru u troloxu jakožto standardu používaného pro hodnocení antioxidační aktivity a to ve všech výše uvedených krocích (podmínky měření 1-5).

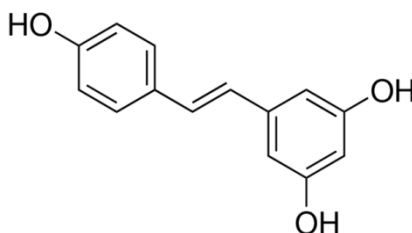


## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro zpracování výsledků byly odečteny výšky a plochy signálů u všech třech cyklů po proměření každého bodu testované řady vzorků v programu Microsoft Office Excel 2007. Data měření byla zanesena do tabulek. Byly vypočítány průměrné hodnoty zjištěných dat, tzn. výšky a plochy pod píkem, dále byly vypočítány směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky. Do grafů byly zaneseny rozdíly průměrů získaného chemiluminiscenčního signálu, kdy od průměrné hodnoty výšky/plochy signálů slepého roztoku byla odečtena každá průměrná hodnota měření výšky/plochy signálů kalibrační řady. Výsledkem byly bodové grafy znázorňující závislost rozdílů průměrných hodnot výšky/plochy signálů na koncentraci.

### 4.1 Resveratrol

Systematický název: 3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilben<sup>23</sup>



Obrázek č. 1 – struktura resveratrolu<sup>23</sup>

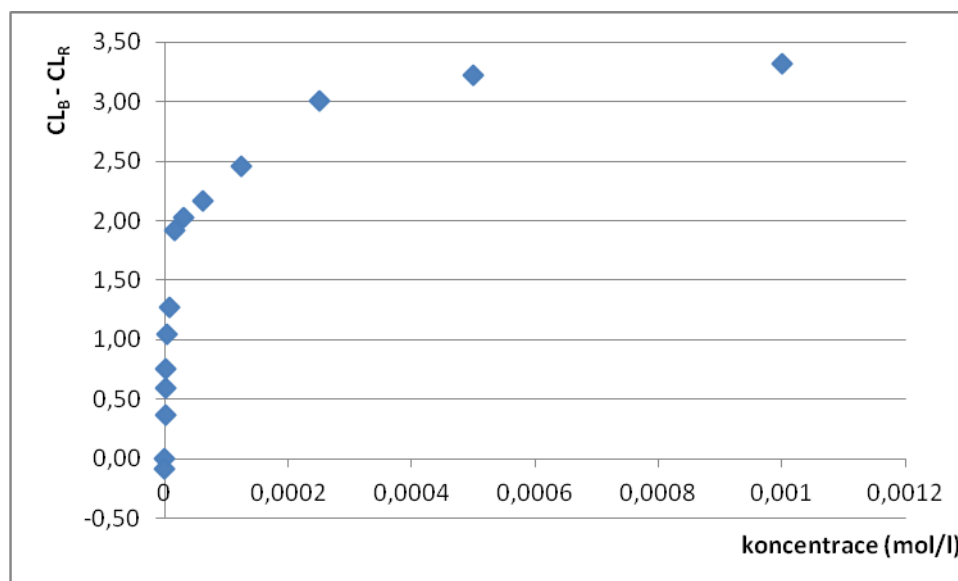
#### 4.1.1 Podmínky měření č. 1

Byly nastaveny podmínky měření č. 1 - zásobní roztok peroxid vodíku o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok hexakvanoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok luminolu o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l v roztoku hydroxidu sodného.

Nejdříve byl proměřen slepý vzorek (blank –B) a dále jednotlivé vzorky testované řady od nejvyšší koncentrace po nejnižší. Naměřené hodnoty byly zapsány do tabulek, výšky signálů do Tabulky č. 2 a plochy signálů do Tabulky č. 3. Výsledky tohoto prvního kroku měření byly znázorněny graficky – viz Obrázek č. 2 a č. 3, kde je zachycena závislost rozdílů mezi průměry (chemiluminiscence slepého vzorku a právě měřené chemiluminiscence) na koncentraci vzorků. Obrázek č. 2 graficky popisuje rozdíl výšky signálů a Obrázek č. 3 popisuje rozdíl plochy signálů.

Tabulka č. 2 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí výšek signálů

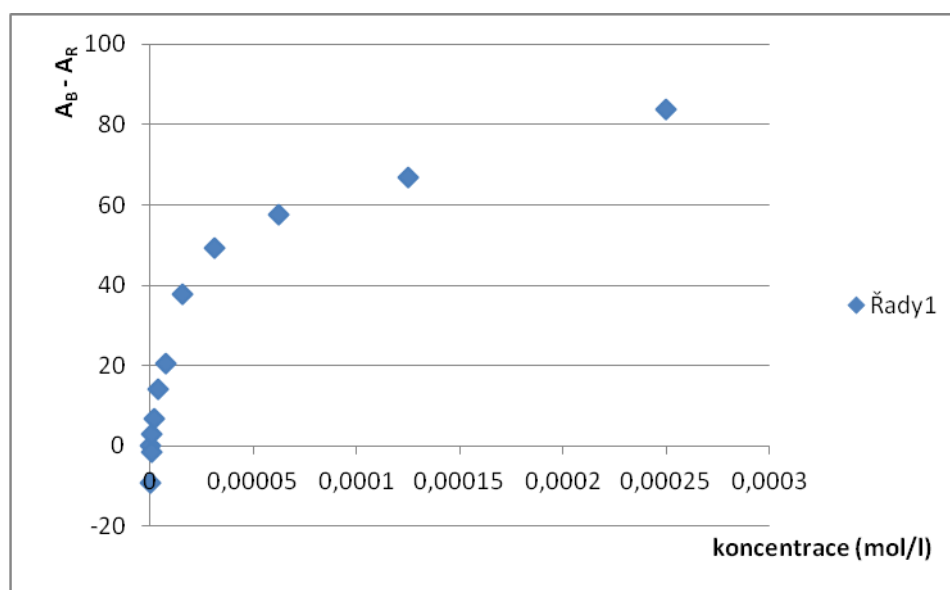
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_R$
referenční	0	3,55	0,03	0,98	0
1	$2,44 \times 10^{-07}$	3,63	0,14	3,92	-0,08
2	$4,88 \times 10^{-07}$	3,19	0,22	6,96	0,37
3	$9,77 \times 10^{-07}$	2,96	0,16	5,56	0,59
4	$1,95 \times 10^{-06}$	2,80	0,16	5,60	0,75
5	$3,91 \times 10^{-06}$	2,51	0,09	3,74	1,04
6	$7,81 \times 10^{-06}$	2,28	0,04	1,64	1,27
7	$1,56 \times 10^{-05}$	1,63	0,17	10,66	1,92
8	$3,13 \times 10^{-05}$	1,53	0,06	4,15	2,03
9	$6,25 \times 10^{-05}$	1,39	0,07	5,28	2,17
10	$1,25 \times 10^{-04}$	1,10	0,03	2,75	2,46
11	$2,50 \times 10^{-04}$	0,55	0,01	1,73	3,00
12	$5,00 \times 10^{-04}$	0,33	0,02	6,03	3,22
13	$1,00 \times 10^{-03}$	0,23	0,05	20,20	3,32



Obr. č. 2 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí výšek signálů

Tabulka č. 3 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (orůměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_R$
referenční	0	87,28	0,88	1,01	0
1	$2,44 \times 10^{-07}$	96,55	0,87	0,90	-9,27
2	$4,88 \times 10^{-07}$	88,65	3,61	4,07	-1,37
3	$9,77 \times 10^{-07}$	84,25	3,51	4,16	3,03
4	$1,95 \times 10^{-06}$	80,47	2,96	3,68	6,81
5	$3,91 \times 10^{-06}$	73,04	1,71	2,34	14,24
6	$7,81 \times 10^{-06}$	66,72	0,97	1,45	20,57
7	$1,56 \times 10^{-05}$	49,48	3,32	6,71	37,80
8	$3,13 \times 10^{-05}$	38,11	0,58	1,53	49,17
9	$6,25 \times 10^{-05}$	29,59	0,92	3,09	57,69
10	$1,25 \times 10^{-04}$	20,49	1,47	7,20	66,79
11	$2,50 \times 10^{-04}$	3,52	1,26	35,86	83,76
12	$5,00 \times 10^{-04}$	2,00	0,44	21,95	85,28



Obr. č. 3 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí ploch signálů

Za podmínek měření č. 1 při hodnocení výšek signálů byla maximální antioxidační aktivita dosažena při koncentraci  $5 \times 10^{-4}$  mol/l, tato koncentrace tedy vykazovala 90% antioxidační účinnost, naopak nejnižší antioxidační aktivita byla zpozorována při koncentraci  $4,88 \times 10^{-7}$  mol/l, antioxidační účinnost resveratrolu byla tedy nalezena v uvedeném koncentračním rozsahu s antioxidační aktivitou v rozmezí 0,09% až 90%. Při hodnocení ploch pod píkem byl koncentrační rozsah 0,18% až 90%, kdy 90% účinnost byla při koncentraci  $5 \times 10^{-4}$  mol/l a nejnižší účinnost antioxidační aktivity byla při koncentraci  $9,77 \times 10^{-7}$  mol/l.

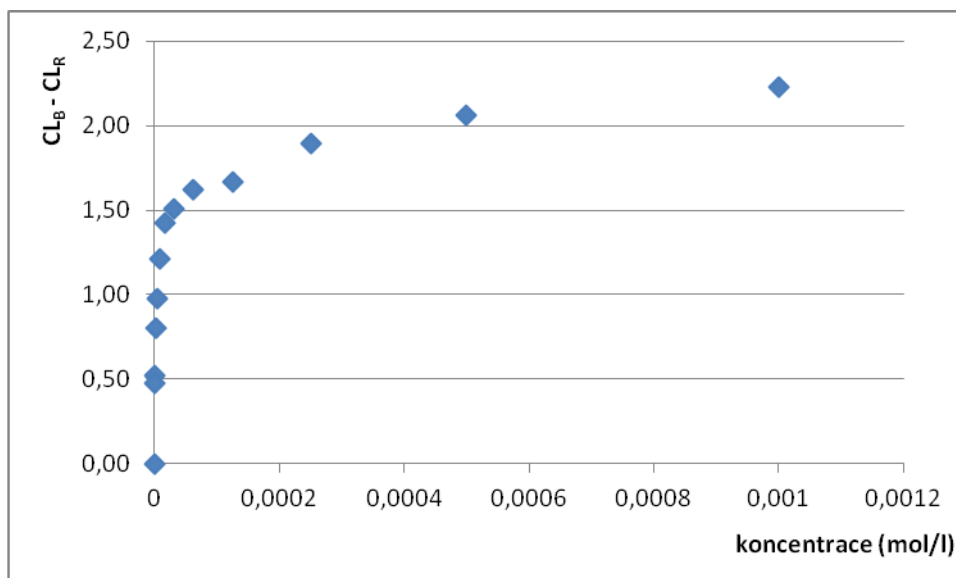
#### 4.1.2 Podmínky měření č. 2

V dalším kroku byly nastaveny tyto podmínky měření - zásobní roztok peroxidu vodíku o koncentraci  $10^{-4}$  mol/l, zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok luminolu v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l.

V Tabulce č. 4 a v Obr. č. 4 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 5 a v Obrázku č. 5 jsou plochy signálů.

Tabulka č. 4 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí výšek signálů

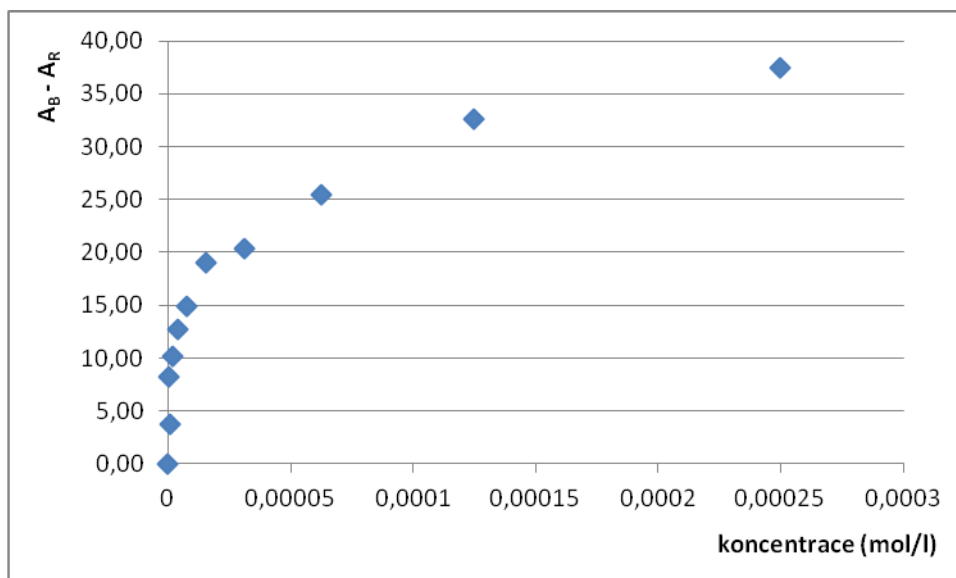
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_R$
referenční	0	2,43	0,14	5,61	0
2	$4,88 \times 10^{-07}$	1,91	0,07	3,46	0,52
3	$9,77 \times 10^{-07}$	1,95	0,03	1,41	0,47
4	$1,95 \times 10^{-06}$	1,62	0,10	6,15	0,80
5	$3,91 \times 10^{-06}$	1,45	0,05	3,56	0,98
6	$7,81 \times 10^{-06}$	1,21	0,12	10,32	1,22
7	$1,56 \times 10^{-05}$	1,00	0,05	4,61	1,43
8	$3,13 \times 10^{-05}$	0,92	0,02	2,28	1,51
9	$6,25 \times 10^{-05}$	0,80	0,00	0,00	1,63
10	$1,25 \times 10^{-04}$	0,76	0,03	3,75	1,67
11	$2,50 \times 10^{-04}$	0,53	0,03	6,44	1,90
12	$5,00 \times 10^{-04}$	0,37	0,05	12,86	2,06
13	$1,00 \times 10^{-03}$	0,20	0,00	0,00	2,23



Obr. č. 4 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí výšek signálů

Tabulka č. 5 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	A <sub>B</sub> - A <sub>R</sub>
referenční	0	40,46	2,28	5,63	0
2	4,88 x 10 <sup>-07</sup>	32,26	2,87	8,90	8,20
3	9,77 x 10 <sup>-07</sup>	36,71	0,41	1,11	3,75
4	1,95 x 10 <sup>-06</sup>	30,25	2,72	8,99	10,21
5	3,91 x 10 <sup>-06</sup>	27,76	3,21	11,55	12,70
6	7,81 x 10 <sup>-06</sup>	25,52	1,92	7,52	14,94
7	1,56 x 10 <sup>-05</sup>	21,40	0,77	3,60	19,05
8	3,13 x 10 <sup>-05</sup>	20,09	0,95	4,73	20,36
9	6,25 x 10 <sup>-05</sup>	15,00	0,00	0,00	25,46
10	1,25 x 10 <sup>-04</sup>	7,89	0,77	9,72	32,57
11	2,50 x 10 <sup>-04</sup>	3,04	0,29	9,51	37,42



Obr. č. 5 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí ploch signálů

Za podmínek měření č. 2 v případě hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $5 \times 10^{-4}$  mol/l, nejnižší pak při koncentraci  $4,88 \times 10^{-7}$  mol/l, antioxidační účinnost byla nalezena tedy v koncentračním rozsahu  $4,88 \times 10^{-7}$  mol/l až  $5 \times 10^{-4}$  mol/l s antioxidační aktivitou 0,09% až 90%. Při hodnocení ploch pod píkem byl koncentrační rozsah  $4,88 \times 10^{-7}$  až  $2,5 \times 10^{-4}$  mol/l s antioxidační aktivitou v rozmezí 0,18% až 90%.

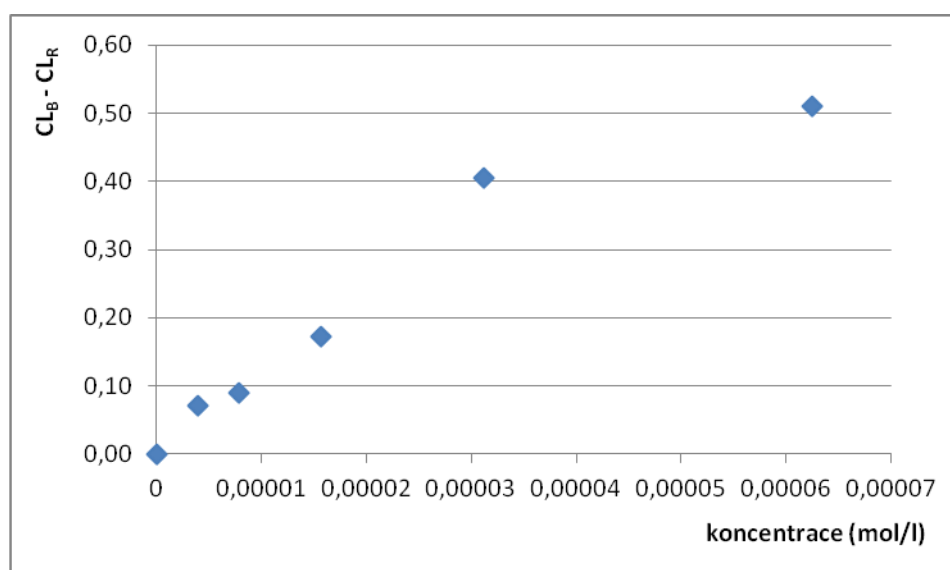
### 4.1.3 Podmínky měření č. 3

Zde byly nastaveny tyto podmínky měření - zásobní roztok peroxidu vodíku o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok luminolu v roztoku hydrogenuhličitanu sodného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l s úpravou pH na 10 pomocí roztoku hydroxidu sodného.

V Tabulce č. 6 a v Obr. č. 6 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 7 a v Obr. č. 7 plochy signálů.

Tabulka č. 6 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí výšek signálů

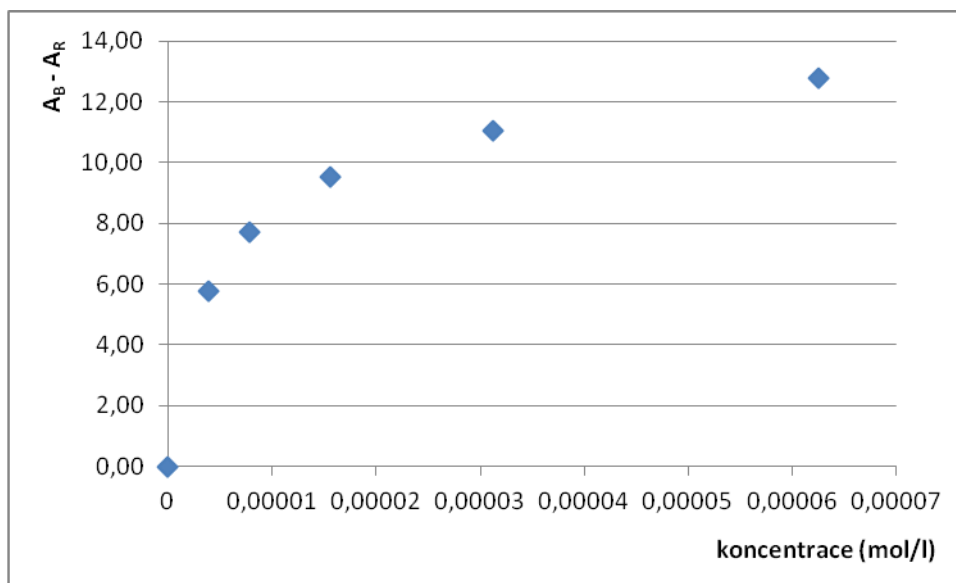
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_R$
referenční	0	0,80	0,02	2,94	0
5	$3,91 \times 10^{-06}$	0,73	0,04	5,64	0,07
6	$7,81 \times 10^{-06}$	0,71	0,04	5,43	0,09
7	$1,56 \times 10^{-05}$	0,63	0,01	2,15	0,17
8	$3,13 \times 10^{-05}$	0,40	0,03	7,62	0,41
9	$6,25 \times 10^{-05}$	0,29	0,02	5,68	0,51
10	$1,25 \times 10^{-04}$	0,20	0,00	0,00	0,60



Obr. č. 6 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí výšek.

Tabulka č. 7 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_R$
referenční	0	16,56	1,06	6,38	0
5	$3,91 \times 10^{-06}$	10,77	1,15	10,67	5,78
6	$7,81 \times 10^{-06}$	8,85	0,36	4,02	7,71
7	$1,56 \times 10^{-05}$	7,04	0,59	8,35	9,52
8	$3,13 \times 10^{-05}$	5,50	0,39	7,10	11,06
9	$6,25 \times 10^{-05}$	3,76	0,79	21,09	12,79



Obr. č. 7 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí výšek signálů

Za těchto podmínek měření byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l a nejnižší při  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l, měřitelný je tedy rozsah antioxidační aktivity od 5,63% do 90%. Takto tomu bylo při měření jak výšek, tak ploch pod pikem.

#### 4.1.4 Podmínky měření č. 4

Měření za podmínek č. 4 - zásobní roztok peroxidu vodíku o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok hexakvanoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok luminolu v roztoku hydrogenuhličitanu sodného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l bez úpravy pH.

U takto nastavených podmínek měření nebylo možné odečíst hodnoty výšky/plochy signálů, neboť se zde vyskytoval šum, který neumožňoval odečtení měřených signálů. Ani po úpravě pracovního napětí z 435 mV na 480 mV a následně pak na 500 mV nebyl vzorek tímto způsobem měřitelný. Hodnota pH roztoku luminolu je totiž jedním z faktorů, které ovlivňují chemiluminiscenci v tomto systému. Zde byla hodnota pH příliš nízká a tak byla v následujícím kroku hodnota pH upravena.



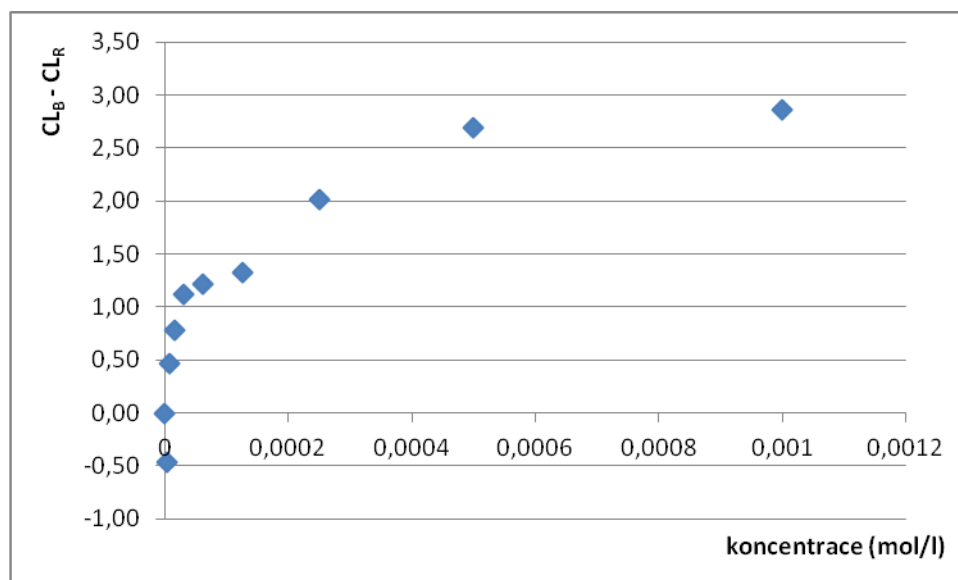
#### 4.1.5 Podmínky měření č. 5

Toto měření proběhlo za těchto podmínek - zásobní roztok peroxidu vodíku o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok hexakvanoželeznatánu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok luminolu v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l. Toto měření proběhlo po změně pracovního napětí na 750 mV.

V Tabulce č. 8 a v Obrázku č. 8 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 9 a v Obrázku č. 9 jsou plochy signálů.

Tabulka č. 8 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí výšek signálů

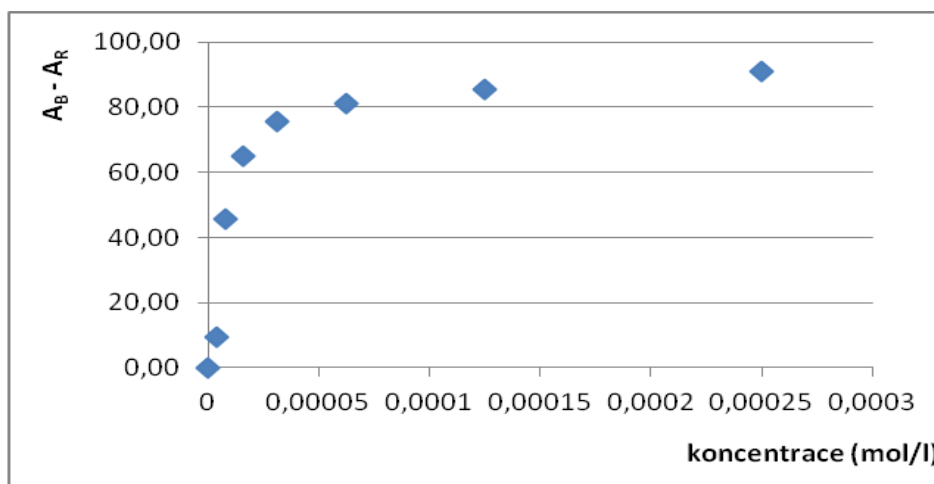
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_R$
referenční	0	3,06	0,13	4,26	0
5	$3,91 \times 10^{-6}$	3,52	0,19	5,42	-0,47
6	$7,81 \times 10^{-6}$	2,59	0,04	1,44	0,47
7	$1,56 \times 10^{-5}$	2,27	0,10	4,46	0,79
8	$3,13 \times 10^{-5}$	1,93	0,08	4,01	1,12
9	$6,25 \times 10^{-5}$	1,84	0,12	6,68	1,21
10	$1,25 \times 10^{-4}$	1,74	0,02	1,01	1,32
11	$2,50 \times 10^{-4}$	1,04	0,15	14,51	2,01
12	$5,00 \times 10^{-4}$	0,37	0,02	6,43	2,69
13	$1,00 \times 10^{-3}$	0,20	0,00	0,00	2,86



Obr. č. 8 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí výšek signálů

Tabulka č. 9 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_R$
referenční	0	93,55	3,84	4,10	0
5	$3,91 \times 10^{-6}$	83,97	4,96	5,90	9,58
6	$7,81 \times 10^{-6}$	47,93	1,15	2,40	45,62
7	$1,56 \times 10^{-5}$	28,54	3,36	11,79	65,01
8	$3,13 \times 10^{-5}$	17,96	0,36	2,01	75,58
9	$6,25 \times 10^{-5}$	12,22	0,24	2,00	81,33
10	$1,25 \times 10^{-4}$	7,94	0,98	12,31	85,61
11	$2,50 \times 10^{-4}$	2,42	0,20	8,38	91,13



Obr. č. 9 - Antioxidační aktivita resveratrolu za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí ploch signálů

Za podmínek měření č. 5 a to při hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita pozorovatelná v rozsahu 1,41% až 90%, kdy 1,41% vykazovala koncentrace  $7,81 \times 10^{-6}$  mol/l a 90% vykazovala koncentrace  $5 \times 10^{-4}$  mol/l. Při pozorování ploch pod píkem byl procentuální rozsah 1,41% až 90%. 90% antioxidační účinnosti byla dosažena při koncentraci  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l a naopak nejnižší antioxidační účinnost byla při koncentraci  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l.

V některých případech nebyly měřitelné hodnoty signálů a to většinou u vyšších koncentrací kalibrační řady, kde splýval šum a naměřené píky (antioxidační aktivita byla příliš vysoká). Tyto neměřitelné hodnoty proto nejsou zaneseny do tabulek a grafů. Všechny výše uvedené podmínky měření č. 1, č. 2, č. 3 a č. 5 lze v praxi využít vyjma podmínek měření č. 4 (luminol v NaHCO<sub>3</sub> bez úpravy pH).

Ze získaných dat lze odvodit, že plocha a výška chemiluminiscenčních signálů je závislá na koncentraci stanovovaných roztoků a tím závislá na jejich antioxidační aktivitě. Čím byla vyšší koncentrace vzorku, tím byla vyšší i antioxidační aktivita a tím byla nižší intenzita chemiluminiscence a to znamenalo nižší hodnoty výšek a ploch změřených píků.

S rostoucí koncentrací antioxidantu se zmenšuje výška píku (popř. plocha pod píkem) a roste rozdíl průměrů signálů, kdy je tento rozdíl průměrů vypočítaný z naměřených hodnot slepého vzorku a testované koncentrace resveratrolu. Roste antioxidační aktivita a závisle na tomto vzrůstu klesá intenzita chemiluminiscence, tzn. čím je vyšší koncentrace antioxidantu, tím je nižší chemiluminiscence. Maximální antioxidační aktivita je nalezena tehdy, kdy je intenzita chemiluminiscence neměřitelná nebo minimální a to je v nejvyšších koncentracích testované řady antioxidantu, tam je minimální detekovatelná výška (popř. plocha) píku.

V případě měření za podmínek č. 1 při hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita maximální při koncentraci antioxidantu  $5 \times 10^{-4}$  mol/l a minimální při koncentraci  $4,88 \times 10^{-7}$  mol/l. Při hodnocení ploch signálů byl průběh antioxidační kapacity pozorován v koncentračním rozsahu  $5 \times 10^{-4}$  mol/l až  $9,77 \times 10^{-07}$  mol/l.

Za podmínek měření č. 2 v případě hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $5 \times 10^{-4}$  mol/l, nejnižší pak při koncentraci  $4,88 \times 10^{-7}$  mol/l. Při hodnocení ploch pod píkem:  $2,5 \times 10^{-4}$  mol/l až  $4,88 \times 10^{-7}$  mol/l.

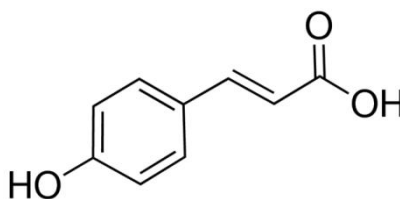
Při hodnocení podmínek měření č. 3 byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l a nejnižší při  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l a to při hodnocení výšek i ploch signálů.

Za podmínek měření č. 5 a to při hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita pozorovatelná v rozsahu  $5 \times 10^{-4}$  mol/l až  $7,81 \times 10^{-6}$  mol/l. Při hodnocení ploch pod píkem:  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l až  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l.

Nejvyšší koncentrační rozsah pro hodnocení nárůstu antioxidační aktivity byl v případě měření za podmínek měření č. 1 a č. 2. Koncentrační rozsahy v těchto dvou případech byly velmi podobné a popisovaly nejpodrobněji nárůst antioxidační aktivity pozorovaného resveratrolu.

## 4.2 Kyselina p-kumarová

Systematický název: *trans*-4-hydroxyskořicová kyselina<sup>24</sup>



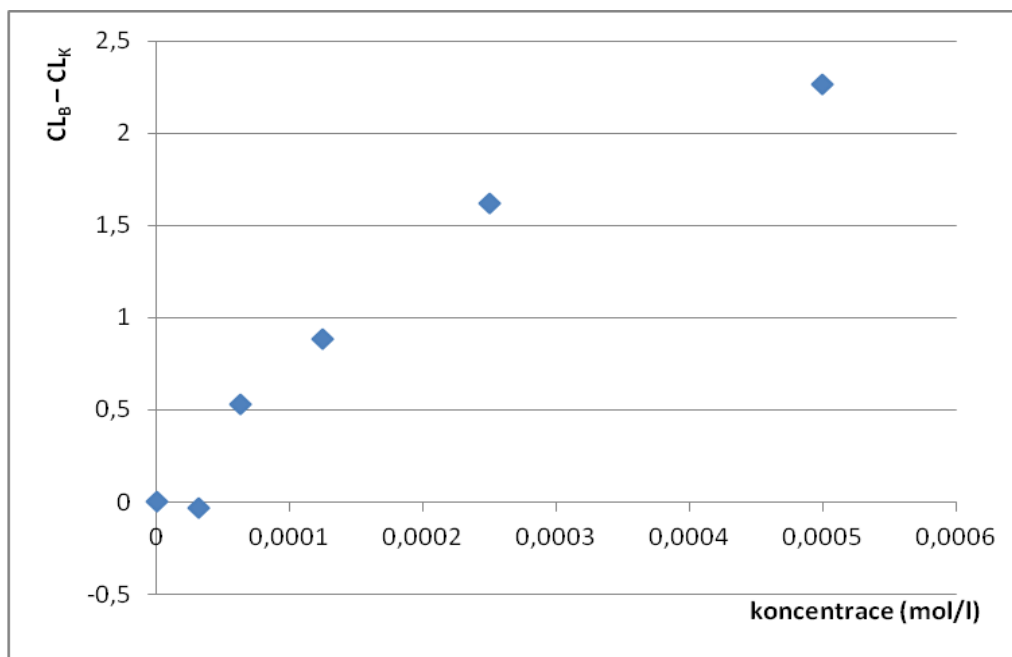
Obrázek č. 10 – struktura kyseliny p-kumarové<sup>24</sup>

### 4.2.1 Podmínky měření č. 1

V Tabulce č. 10 a v Obr. č. 11 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 11 a v Obrázku č. 12 jsou plochy signálů.

Tabulka č. 10 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí výšek signálů

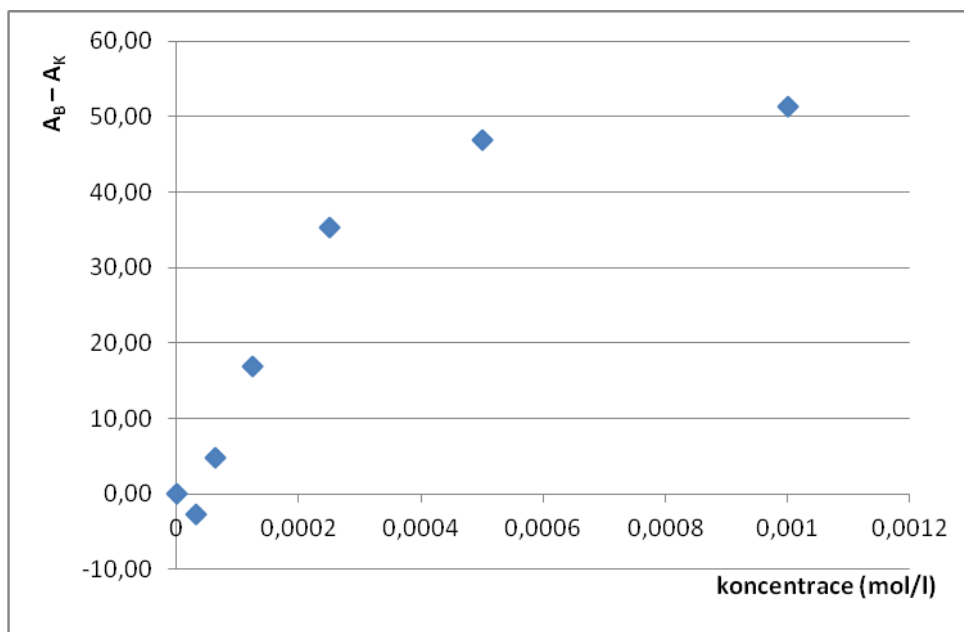
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	CL <sub>B</sub> – CL <sub>K</sub>
referenční	0	3,27	0,06	1,99	0
8	3,13 x 10 <sup>-05</sup>	3,30	0,09	2,61	-0,03
9	6,25 x 10 <sup>-05</sup>	2,73	0,11	4,04	0,53
10	1,25 x 10 <sup>-04</sup>	2,38	0,16	6,92	0,88
11	2,50 x 10 <sup>-04</sup>	1,65	0,04	2,57	1,62
12	5,00 x 10 <sup>-04</sup>	1,00	0,05	4,86	2,26



Obr. č. 11 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí výšek signálů.

Tabulka č. 11 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_K$
referenční	0	76,45	0,58	0,76	0
8	$3,13 \times 10^{-5}$	79,20	0,35	0,44	-2,76
9	$6,25 \times 10^{-5}$	71,58	2,98	4,16	4,87
10	$1,25 \times 10^{-4}$	59,57	1,88	3,16	16,87
11	$2,50 \times 10^{-4}$	41,06	1,34	3,25	35,38
12	$5,00 \times 10^{-4}$	29,49	0,39	1,34	46,95
13	$1,00 \times 10^{-3}$	25,07	2,95	11,78	51,38



Obr. č. 12 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí ploch signálů

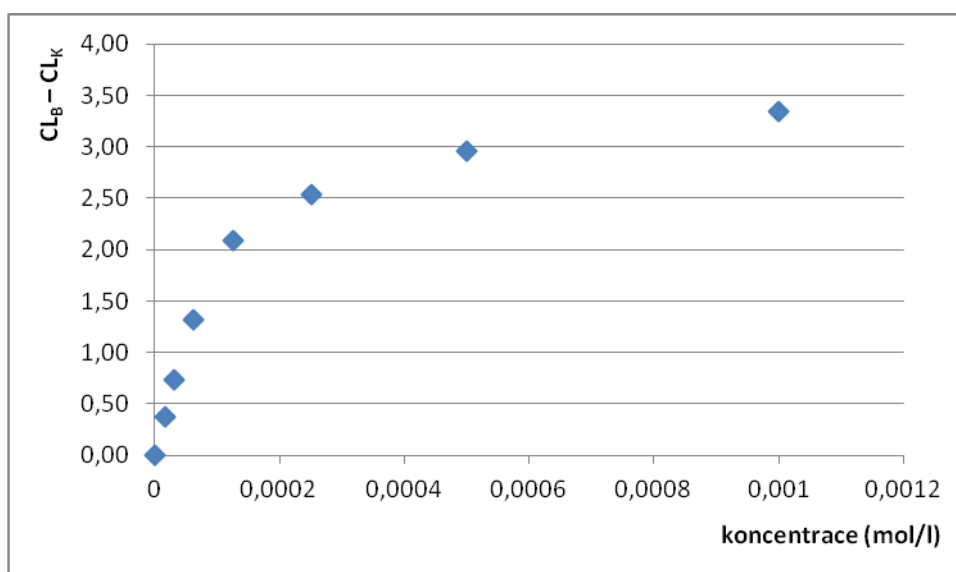
Za těchto podmínek měření č. 1 při hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové pozorovatelná v rozsahu 11,25% až 90%, kdy 90% vykazovala koncentrace  $5 \times 10^{-4}$  mol/l a nejnižší koncentrace byla  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l. Při pozorování ploch pod píkem za stejných podmínek byl procentuální rozsah 5,63% až 90% a 90% antioxidační účinnost byla nalezena při koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l a nejnižší při koncentraci  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l.

#### 4.2.2 Podmínky měření č. 2

V Tabulce č. 12 a v Obr. č. 13 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 13 a v Obrázku č. 14 jsou plochy signálů.

Tabulka č. 12 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí výšek signálů

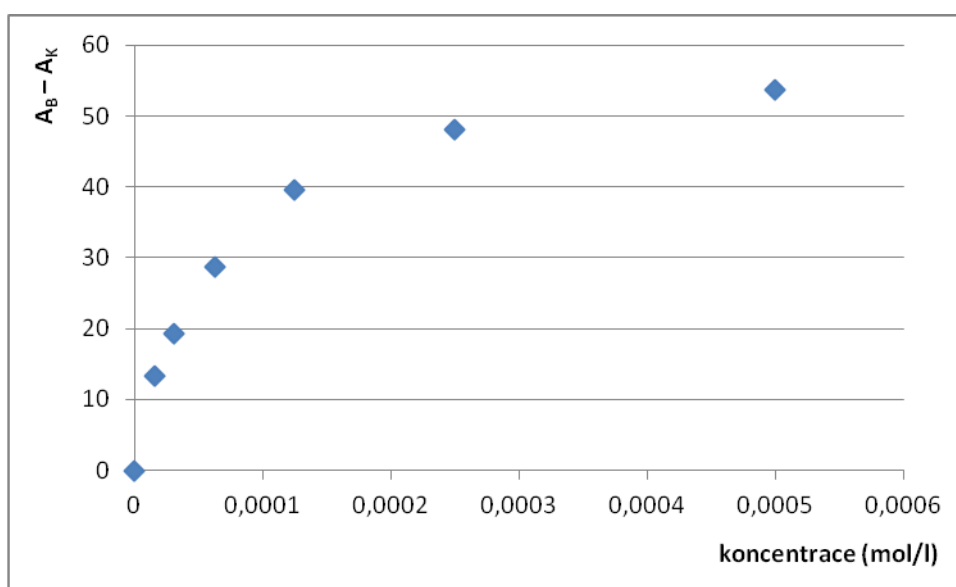
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_K$
referenční	0	3,66	0,04	1,13	0
7	$1,56 \times 10^{-5}$	3,28	0,08	2,41	0,38
8	$3,13 \times 10^{-5}$	2,93	0,03	1,02	0,73
9	$6,25 \times 10^{-5}$	2,34	0,05	2,04	1,32
10	$1,25 \times 10^{-4}$	1,57	0,06	3,55	2,09
11	$2,50 \times 10^{-4}$	1,12	0,02	1,52	2,54
12	$5,00 \times 10^{-4}$	0,71	0,02	2,25	2,95
13	$1,00 \times 10^{-3}$	0,32	0,02	7,44	3,35



Obr. č. 13 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí výšek signálů

Tabulka č. 13 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_K$
referenční	0	65,07	1,58	2,42	0
7	$1,56 \times 10^{-5}$	51,84	1,09	2,10	13,24
8	$3,13 \times 10^{-5}$	45,75	0,56	1,23	19,32
9	$6,25 \times 10^{-5}$	36,46	0,46	1,26	28,61
10	$1,25 \times 10^{-4}$	25,55	0,94	3,70	39,53
11	$2,50 \times 10^{-4}$	16,93	0,77	4,53	48,15
12	$5,00 \times 10^{-4}$	11,42	1,01	8,81	53,66



Obr. č. 14 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí ploch signálů

Za podmínek měření č. 2 při hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l, nejnižší při koncentraci  $1,56 \times 10^{-5}$  mol/l, antioxidační účinnost byla nalezena v rozsahu 1,40% až 90%. Při hodnocení ploch pod píkem byl rozsah antioxidační aktivity 2,81% až 90%, kdy 90% účinnost byla nalezena při koncentraci  $5 \times 10^{-4}$  mol/l a nejnižší koncentrace vykazující antioxidační aktivitu byla  $1,56 \times 10^{-5}$  mol/l.

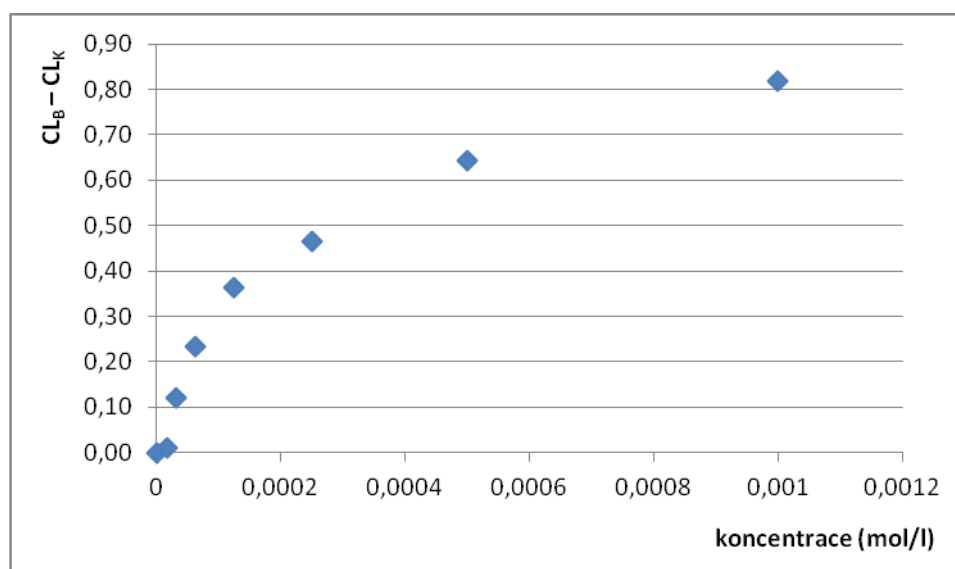


### 4.2.3 Podmínky měření č. 3

V Tabulce č. 14 a v Obr. č. 15 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 15 a v Obr. č. 16 plochy signálů.

Tabulka č. 14 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí výšek signálů

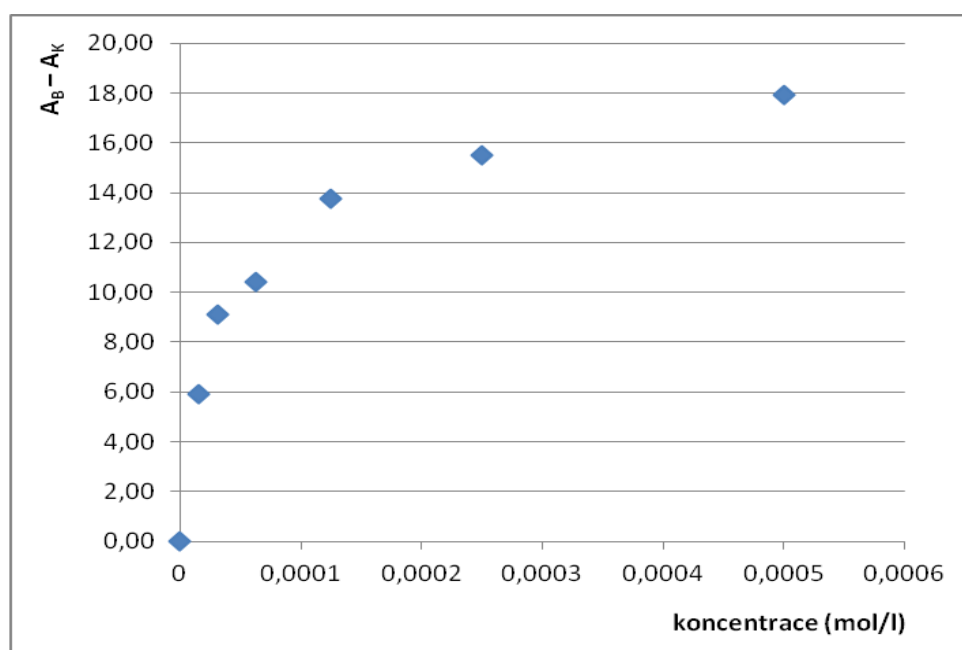
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_K$
referenční	0	1,05	0,03	2,72	0
7	$1,56 \times 10^{-5}$	1,04	0,04	3,94	0,01
8	$3,13 \times 10^{-5}$	0,93	0,03	3,64	0,12
9	$6,25 \times 10^{-5}$	0,82	0,02	2,36	0,23
10	$1,25 \times 10^{-4}$	0,69	0,01	0,83	0,36
11	$2,50 \times 10^{-4}$	0,58	0,04	7,24	0,47
12	$5,00 \times 10^{-4}$	0,41	0,00	1,10	0,64
13	$1,00 \times 10^{-3}$	0,23	0,05	20,20	0,82



Obr. č. 15 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí výšek signálů

Tabulka č. 15 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_K$
referenční	0	23,60	0,31	1,31	0
7	$1,56 \times 10^{-5}$	17,70	0,68	3,82	5,89
8	$3,13 \times 10^{-5}$	14,48	0,35	2,43	9,12
9	$6,25 \times 10^{-5}$	13,17	2,04	15,52	10,43
10	$1,25 \times 10^{-4}$	9,84	1,13	11,54	13,76
11	$2,50 \times 10^{-4}$	8,07	0,64	7,98	15,52
12	$5,00 \times 10^{-4}$	5,69	0,53	9,36	17,91



Obr. č. 16 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí ploch signálů

Při měření výšek signálů byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l, nejnižší naopak při koncentraci  $3,13 \times 10^{-5}$  mol/l, antioxidační aktivita byla tedy nalezena v rozsahu 2,82% až 90%. Při hodnocení ploch pod píkem byl procentuální rozsah aktivity 2,81% až 90%, kdy 90% účinnost vykazovala koncentrace  $5 \times 10^{-4}$  mol/l a nejnižší účinnost byla hodnocena pro koncentraci  $1,56 \times 10^{-5}$  mol/l.

#### 4.2.4 Podmínky měření č. 4

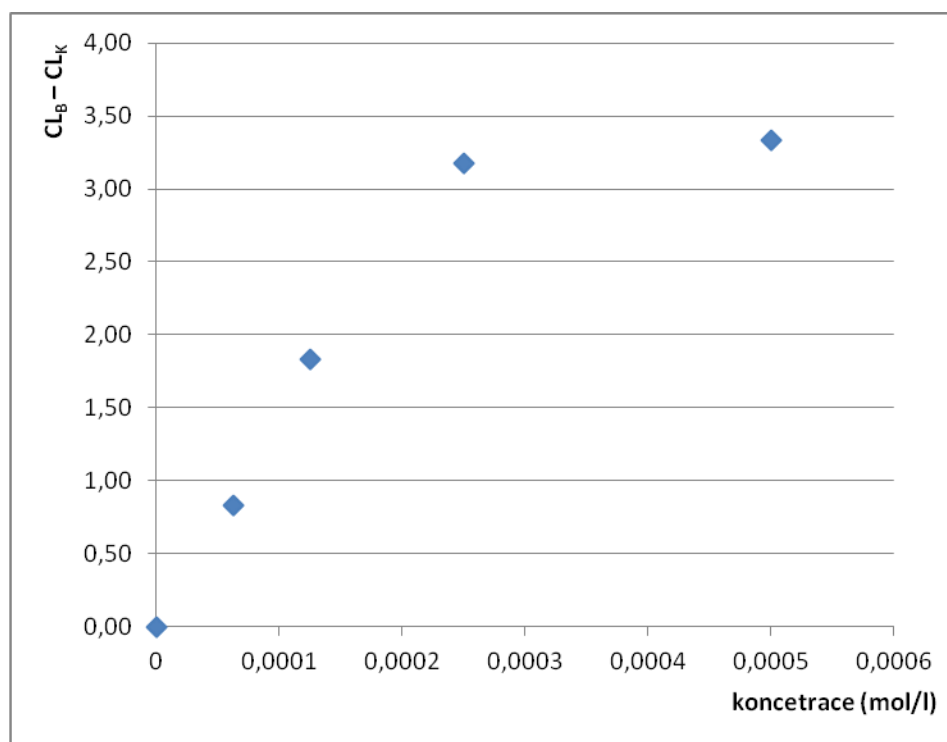
Tak jako u předcházejících vzorků ani tento vzorek kyseliny p-kumarové nebyl měřitelný za podmínek měření č. 4 a to ani po úpravě pracovního napětí.

#### 4.2.5 Podmínky měření č. 5

V Tabulce č. 16 a v Obrázku č. 17 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 17 a v Obrázku č. 18 jsou plochy signálů.

Tabulka č. 16 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí výšek signálů

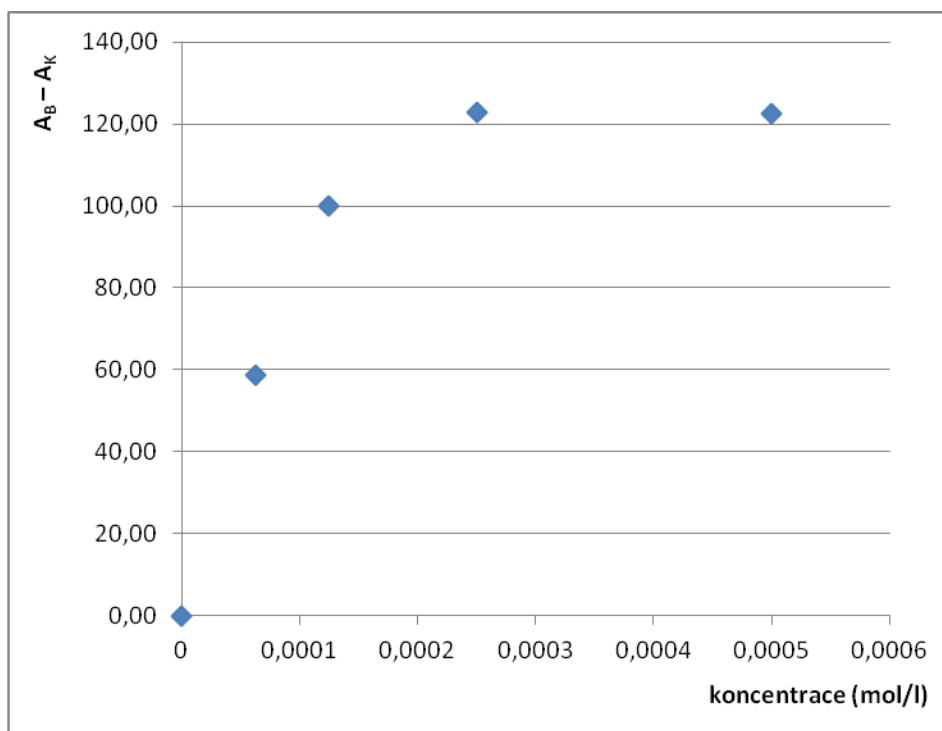
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_K$
referenční	0	4,54	0,12	2,74	0
9	$6,25 \times 10^{-5}$	3,70	0,35	9,44	0,83
10	$1,25 \times 10^{-4}$	2,70	0,47	17,57	1,84
11	$2,50 \times 10^{-4}$	1,37	0,12	8,45	3,17
12	$5,00 \times 10^{-4}$	1,20	0,01	0,91	3,34



Obr. č. 17 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí výšek signálů

Tabulka č. 17 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_K$
referenční	0	137,02	1,58	1,15	0
9	$6,25 \times 10^{-5}$	78,26	6,69	8,55	58,76
10	$1,25 \times 10^{-4}$	37,00	8,90	24,06	100,03
11	$2,50 \times 10^{-4}$	14,18	4,33	30,54	122,85
12	$5,00 \times 10^{-4}$	14,43	8,38	58,06	122,59



Obr. č. 18 - Antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí ploch signálů

Při měření za podmínek č. 5 při hodnocení výšek signálů byla antioxidační účinnost nejvyšší při koncentraci  $5 \times 10^{-4}$  mol/l, nejnižší při  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l, antioxidační účinnost byla hodnocena v rozsahu 11,25% až 90%. Při hodnocení ploch pod píkem byla 100% účinnost nalezena při koncentraci  $5 \times 10^{-4}$  mol/l, nejnižší aktivita byla při koncentraci  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l. Koncentrační rozsah antioxidační účinnosti byl 11,25% až 100%, tak jako tomu bylo u hodnocení výšek signálů.

V některých případech nebyly měřitelné hodnoty signálů a to většinou u vyšších koncentrací kalibrační řady, kde splýval šum a naměřené píky (antioxidační aktivita byla příliš vysoká). Tyto hodnoty nejsou proto zde použity v tabulkách a grafech.

Všechny výše uvedené podmínky měření č. 1, č. 2, č. 3 a č. 5 lze v praxi využít vyjma podmínek měření č. 4 (luminol v NaHCO<sub>3</sub> bez úpravy pH).

Za podmínek měření č. 1 při hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita kyseliny p-kumarové detekovatelná v rozsahu koncentrace 5 x 10<sup>-4</sup> mol/l až 6,25 x 10<sup>-5</sup> mol/l. Při pozorování ploch pod píkem: 1 x 10<sup>-3</sup> mol/l až 6,25 x 10<sup>-5</sup> mol/l

Za podmínek č. 2 při hodnocení výšek signálů byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci 1 x 10<sup>-3</sup> mol/l, nejnižší při koncentraci 1,56 x 10<sup>-5</sup> mol/l. Při hodnocení ploch pod píkem: 5 x 10<sup>-4</sup> mol/l až 1,56 x 10<sup>-5</sup> mol/l.

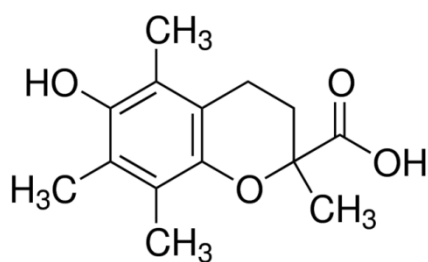
Při měření za podmínek č. 3 u výšek signálů byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci 1 x 10<sup>-3</sup> mol/l, nejnižší naopak při 3,13 x 10<sup>-5</sup> mol/l. V případě ploch pod píkem: 5 x 10<sup>-4</sup> mol/l až 1,56 x 10<sup>-5</sup> mol/l.

Hodnocení výšek signálů za podmínek č. 5 - antioxidační účinnost byla nejvyšší při koncentraci 5 x 10<sup>-4</sup> mol/l a nejnižší při 6,25 x 10<sup>-5</sup> mol/l. Hodnocení ploch pod píkem: 5 x 10<sup>-4</sup> mol/l až 6,25 x 10<sup>-5</sup> mol/l.

Nejdetailnější popis průběhu nárůstu antioxidační aktivity kyseliny p-kumarové poskytují podmínky měření č. 1 a č. 2. Tyto podmínky poskytují a popisují nejvyšší rozsah koncentrace antioxidantu z pěti výše uvedených podmínek měření. Rozsah koncentrací za podmínek č. 1 a č. 2 je obdobný.

### 4.3 Trolox

Systematický název: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina<sup>25</sup>



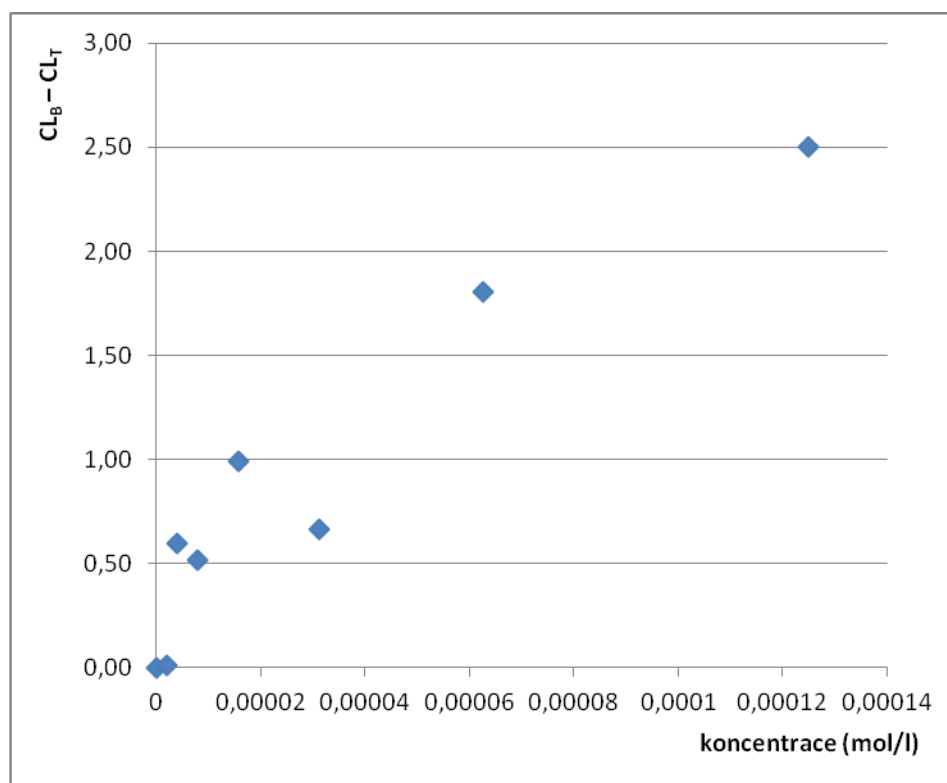
Obrázek č. 19 – struktura troloxu<sup>25</sup>

### 4.3.1 Podmínky měření č. 1

V Tabulce č. 18 a v Obr. č. 20 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 19 a v Obrázku č. 21 jsou plochy signálů.

Tabulka č. 18 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí výšek signálů

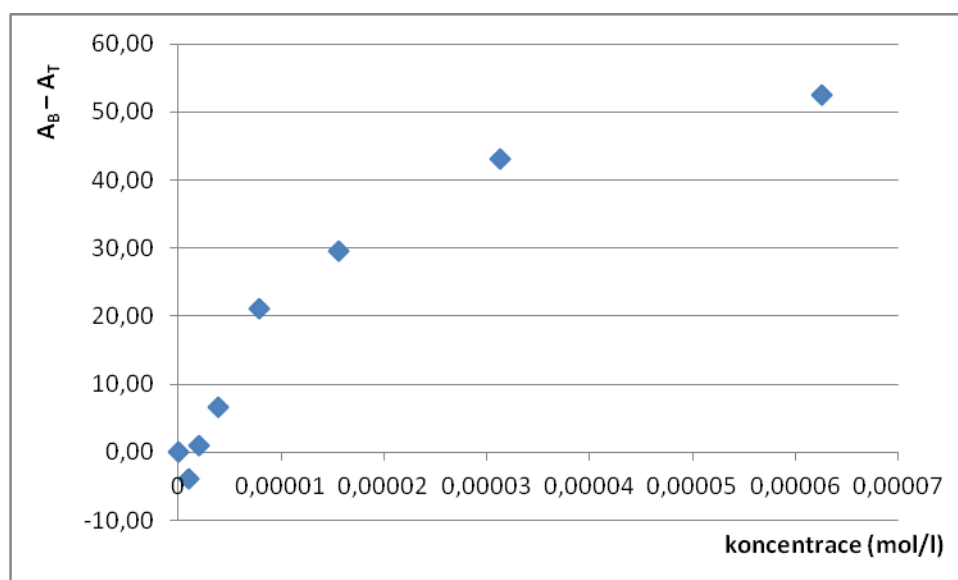
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_T$
referenční	0	3,54	0,25	6,99	0
4	$1,95 \times 10^{-6}$	3,53	0,27	7,71	0,01
5	$3,91 \times 10^{-6}$	2,94	0,08	2,72	0,60
6	$7,81 \times 10^{-6}$	3,02	0,21	6,96	0,52
7	$1,56 \times 10^{-5}$	2,55	0,30	11,94	0,99
8	$3,13 \times 10^{-5}$	2,88	0,32	10,97	0,66
9	$6,25 \times 10^{-5}$	1,74	0,14	7,98	1,80
10	$1,25 \times 10^{-4}$	1,04	0,06	5,54	2,50
11	$2,50 \times 10^{-4}$	0,35	0,04	11,66	3,19



Obr. č. 20 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí výšek signálů.

Tabulka č. 19 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_T$
referenční	0	71,39	6,46	9,06	0
3	$9,77 \times 10^{-07}$	75,28	7,54	10,01	-3,90
4	$1,95 \times 10^{-06}$	70,49	0,79	1,12	0,90
5	$3,91 \times 10^{-06}$	64,85	2,74	4,22	6,53
6	$7,81 \times 10^{-06}$	50,2	5,04	10,03	21,19
7	$1,56 \times 10^{-05}$	41,89	2,51	5,98	29,50
8	$3,13 \times 10^{-05}$	28,26	2,13	7,52	43,13
9	$6,25 \times 10^{-05}$	18,83	0,64	3,39	52,56



Obr. č. 21 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 1 znázorněná pomocí ploch signálů

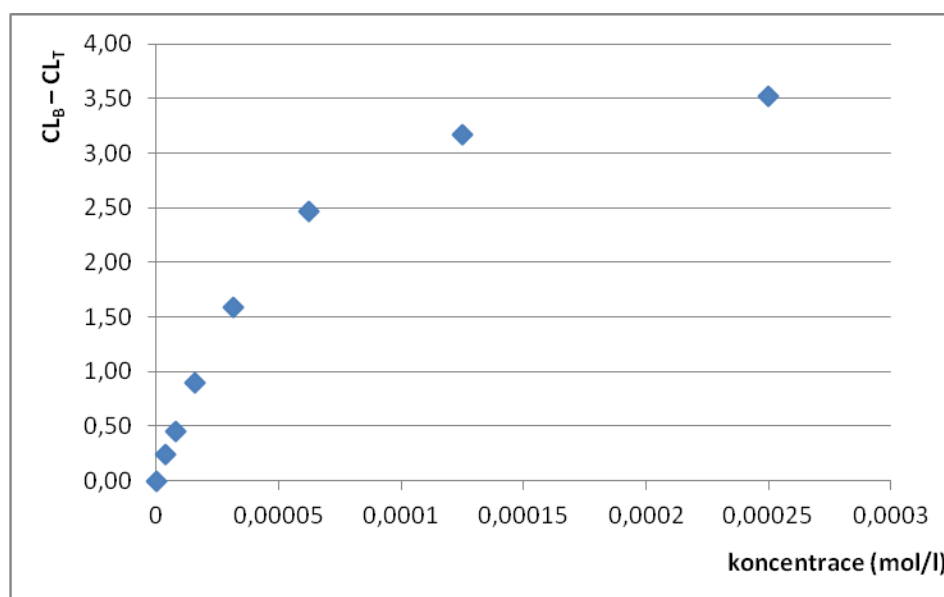
Při hodnocení výšek signálů troloxu za podmínek č. 1 byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $2,5 \times 10^{-4}$  mol/l, tato koncentrace již tedy vykazovala 90% antioxidační účinnost, nejnižší antioxidační aktivita byla zpozorována při koncentraci  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l, antioxidační účinnost troloxu se pohybovala v rozsahu 1,41% až 90%. Při hodnocení ploch pod píkem byl rozsah 2,81% až 90%, 90% účinnost byla nalezena při koncentraci  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l a při účinnosti 2,81% byla koncentrace  $1,95 \times 10^{-6}$  mol/l.

### 4.3.2 Podmínky měření č. 2

V Tabulce č. 20 a v Obr. č. 22 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 21 a v Obrázku č. 23 jsou plochy signálů.

Tabulka č. 20 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí výšek signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_T$
referenční	0	3,74	0,19	4,96	0
5	$3,91 \times 10^{-06}$	3,50	0,08	2,38	0,24
6	$7,81 \times 10^{-06}$	3,29	0,13	3,88	0,45
7	$1,56 \times 10^{-05}$	2,85	0,19	6,57	0,90
8	$3,13 \times 10^{-05}$	2,15	0,07	3,21	1,59
9	$6,25 \times 10^{-05}$	1,28	0,05	3,68	2,46
10	$1,25 \times 10^{-04}$	0,58	0,07	11,52	3,17
11	$2,50 \times 10^{-04}$	0,22	0,02	10,88	3,53

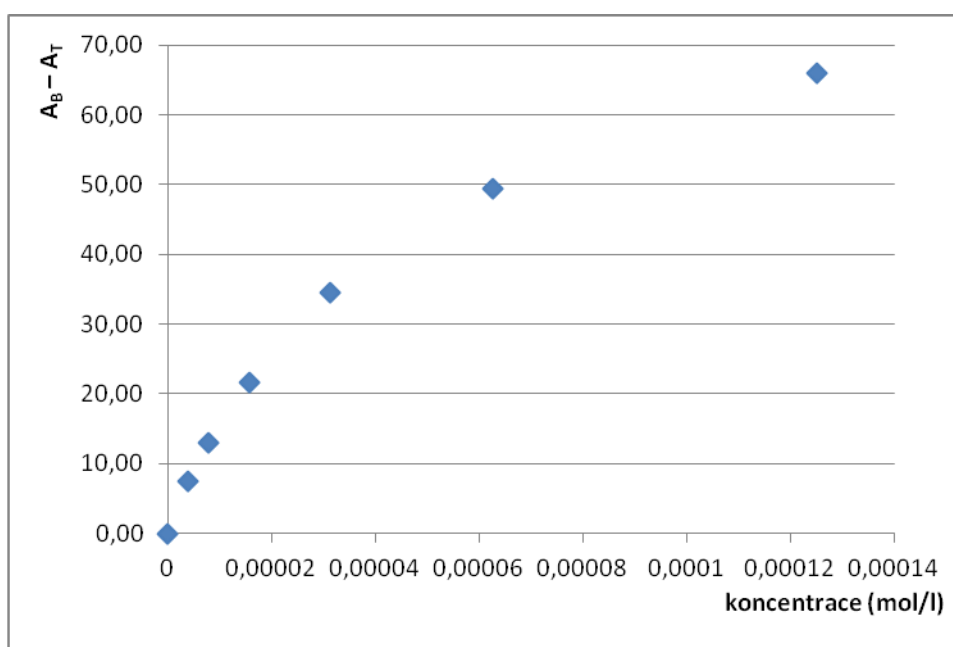


Obr. č. 22 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí výšek signálů



Tabulka č. 21 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_T$
referenční	0	68,99	2,36	3,43	0
5	$3,91 \times 10^{-6}$	61,43	1,45	2,36	7,56
6	$7,81 \times 10^{-6}$	55,98	1,70	3,03	13,00
7	$1,56 \times 10^{-5}$	47,30	4,04	8,55	21,69
8	$3,13 \times 10^{-5}$	34,42	0,99	2,87	34,57
9	$6,25 \times 10^{-5}$	19,65	1,16	5,93	49,33
10	$1,25 \times 10^{-4}$	2,97	0,71	24,01	66,02



Obr. č. 23 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí ploch signálů.

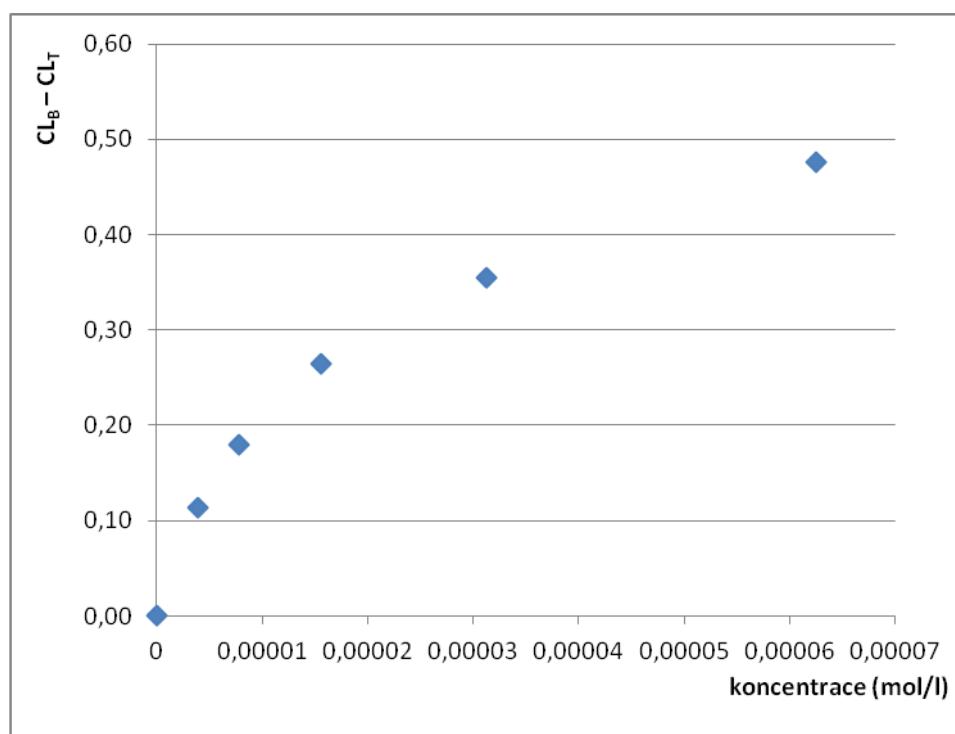
Za podmínek měření č. 2 při pozorování výšek signálů troloxu byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $2,5 \times 10^{-4}$  mol/l, nejnižší koncentrace byla při  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l, antioxidační účinnost byla nalezena v rozsahu 1,41% až 90%. Při hodnocení ploch pod píkem koncentrační rozsah byl v rozmezí od  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l do  $1,25 \times 10^{-4}$ , procentuální rozsah antioxidační aktivity tedy byl 2,82% až 90%.

### 4.3.3 Podmínky měření č. 3

V Tabulce č. 22 a v Obr. č. 24 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 23 a v Obr. č. 25 plochy signálů.

Tabulka č. 22 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí výšek signálů

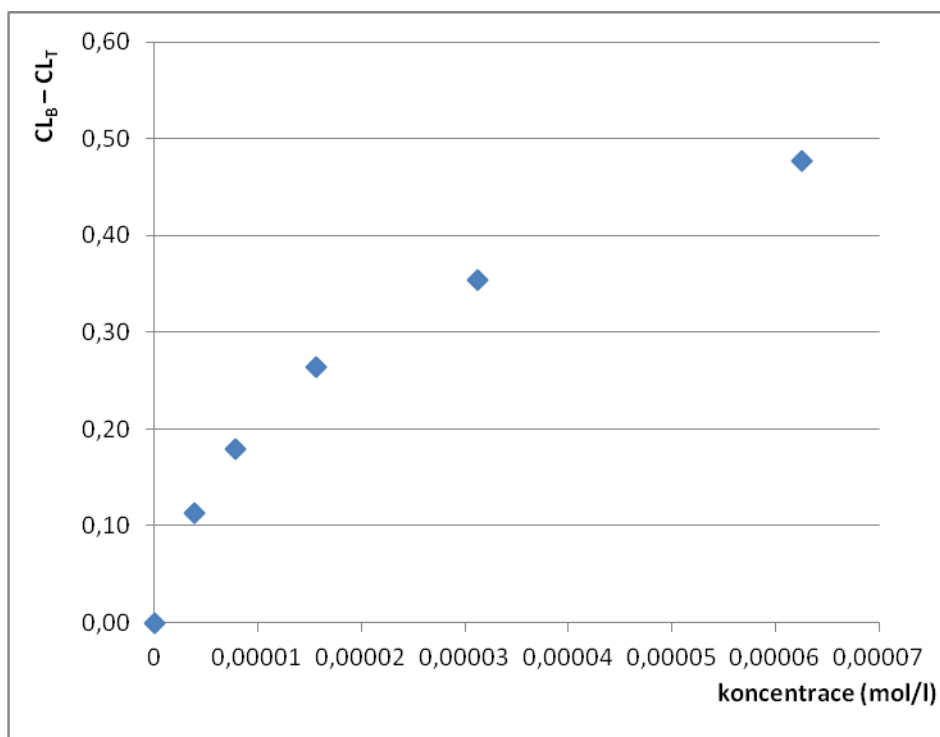
číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_T$
referenční	0	0,74	0,04	5,93	0
5	$3,91 \times 10^{-06}$	0,63	0,07	10,68	0,11
6	$7,81 \times 10^{-06}$	0,56	0,02	4,12	0,18
7	$1,56 \times 10^{-05}$	0,48	0,02	4,65	0,26
8	$3,13 \times 10^{-05}$	0,39	0,03	7,05	0,35
9	$6,25 \times 10^{-05}$	0,27	0,02	8,84	0,48



Obr. č. 24 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí výšek signálů.

Tabulka č. 23 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_T$
referenční	0	12,05	0,40	3,32	0
5	$3,91 \times 10^{-6}$	11,31	0,38	3,40	0,74
6	$7,81 \times 10^{-6}$	8,88	0,79	8,93	3,17
7	$1,56 \times 10^{-5}$	7,76	0,50	6,42	4,29
8	$3,13 \times 10^{-5}$	5,31	0,69	12,93	6,74



Obr. č. 25 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 3 znázorněná pomocí ploch signálů.

Při měření výšek signálů troloxu za těchto podmínek byla antioxidační aktivita nejvyšší již při koncentraci  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l, nejnižší naopak při koncentraci  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l, antioxidační aktivita byla v procentuálním rozsahu 5,63% až 90%. V případě ploch pod píkem byl rozsah 11,24% až 90%, kdy 90% aktivita antioxidantu vykazovala koncentrace  $3,13 \times 10^{-5}$  mol/l a nejnižší aktivita byla nalezena při koncentraci  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l.

#### 4.3.4 Podmínky měření č. 4

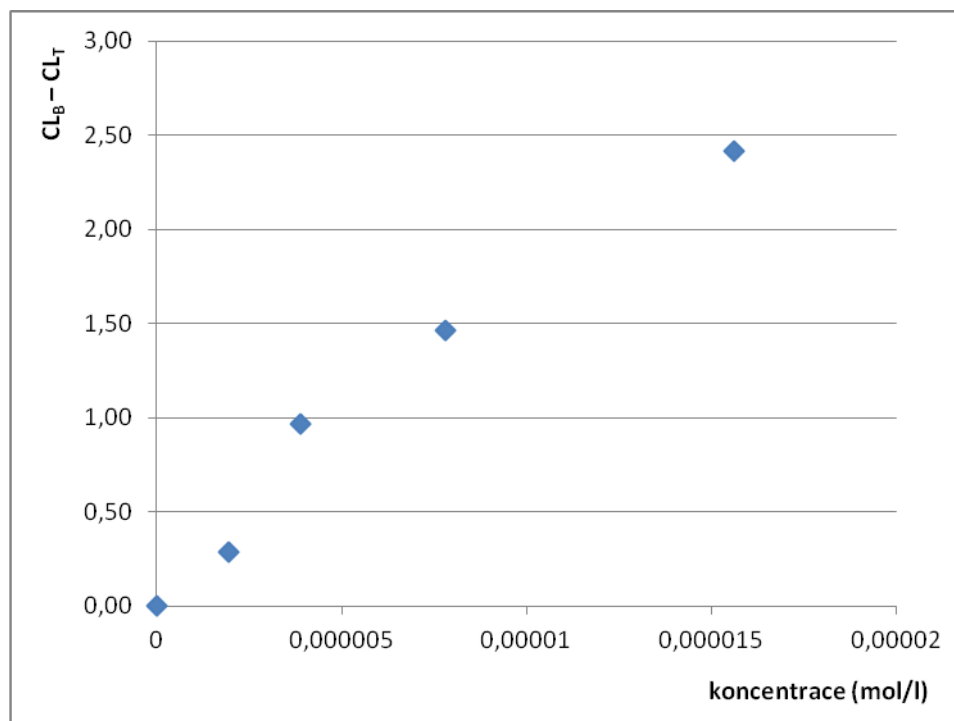
Tak jako u předcházejících vzorků ani tento vzorek troloxu nebyl měřitelný za podmínek měření č. 4 a to ani po úpravě pracovního napětí.

#### 4.3.5 Podmínky měření č. 5

V Tabulce č. 24 a v Obrázku č. 26 jsou uvedeny výšky signálů, v Tabulce č. 25 jsou plochy signálů.

Tabulka č. 24 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí výšek signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	výška signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$CL_B - CL_T$
referenční	0	3,42	0,58	16,94	0
4	$1,95 \times 10^{-6}$	3,13	0,16	5,01	0,29
5	$3,91 \times 10^{-6}$	2,45	0,07	2,98	0,96
6	$7,81 \times 10^{-6}$	1,95	0,16	8,17	1,46
7	$1,56 \times 10^{-5}$	1,00	0,00	0,00	2,42



Obr. č. 26 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí výšek signálů

Tabulka č. 25 - Antioxidační aktivita troloxu za podmínek měření č. 5 znázorněná pomocí ploch signálů

číslo vzorku	koncentrace (mol/l)	plocha signálu (průměr)	SD	RSD (%)	$A_B - A_T$
referenční	0	73,96	7,31	9,89	0
3	$9,77 \times 10^{-07}$	194,32	13,26	6,82	-120,36
4	$1,95 \times 10^{-06}$	154,67	12,30	7,96	-80,71
5	$3,91 \times 10^{-06}$	95,45	9,88	10,35	-21,49

Rozsah antioxidační účinnosti za podmínek měření č. 5 při hodnocení výšek signálů byl 22,59% až 90%, kdy nejnižší účinnost byla při koncentraci  $1,96 \times 10^{-6}$  mol/l a nejvyšší již při koncentraci  $7,81 \times 10^{-6}$  mol/l.

U posledního měření ploch pod píkem nebyly výsledky hodnotitelné, rozdíly průměrů ploch byly klesající, na rozdíl od předcházejících hodnot – tam byly hodnoty vždy stoupající. Důvodem vzniku této situace byly nejspíše nestandardní podmínky měření – vliv světla apod., nebo došlo k chybnému odečtení signálů. Naměřené hodnoty tedy byly záporné, nebyly proto zaneseny do grafu.

Při hodnocení výšek signálů troloxu za podmínek č. 1 byla antioxidační aktivita nejvyšší při koncentraci  $2,5 \times 10^{-4}$  mol/l a nejnižší při  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l. Hodnocení ploch pod píkem: rozsah koncentrace  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l. až  $1,95 \times 10^{-6}$  mol/l.

Za podmínek č. 2 při hodnocení výšek signálů troloxu byl rozsah koncentrace  $2,5 \times 10^{-4}$  mol/l až  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l. V případě ploch pod píkem:  $1,25 \times 10^{-4}$  mol/l až  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l.

Za podmínek č. 3 byla antioxidační aktivita nejvyšší již při koncentraci  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l, nejnižší při koncentraci  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l. V případě ploch pod píkem:  $3,13 \times 10^{-5}$  mol/l až  $3,91 \times 10^{-6}$  mol/l.

Podmínky č. 4 nebyly použitelné v hodnocení antioxidační aktivity troloxu, jako tomu bylo u vzorků resveratrolu a kyseliny p-kumarové.

Podmínky č. 5 - při hodnocení výšek byla nejnižší účinnost při koncentraci  $1,96 \times 10^{-6}$  mol/l a nejvyšší při  $7,81 \times 10^{-6}$  mol/l, plochy pod píkem nebyly hodnotitelné.

Nejvyšší koncentrační rozsah pro hodnocení nárůstu antioxidační aktivity byl v případě měření za podmínek měření č. 2, toto měření poskytlo nejpodrobněji nárůst antioxidační aktivity troloxu.

## 5. SOUHRN

V této diplomové práci byly vyhledány optimální podmínky pro stanovení antioxidační aktivity vybraných analytů (resveratrol, kyselina p-kumarová a trolox hodnocený jako standard pro antioxidační aktivitu) v SIA s chemiluminiscenční detekcí založenou na nepřímém luminolovém systému. Výstupem měření byl chemiluminiscenční signál, jehož výška a plocha pod píkem (resp. jejich pokles) závisely na koncentraci antioxidantu. Čím byla vyšší koncentrace antioxidantu, tím byla vyšší antioxidační aktivita a tím byla nižší sledovaná chemiluminiscence.

Chemiluminiscenční činidlem zde byl luminol, který vykazoval chemiluminiscenční záření následně po oxidaci peroxidem vodíku v přítomnosti katalyzátorů. Katalyzátorem byl hexakynoželezitan draselný popř. hexakynoželezitan draselný.

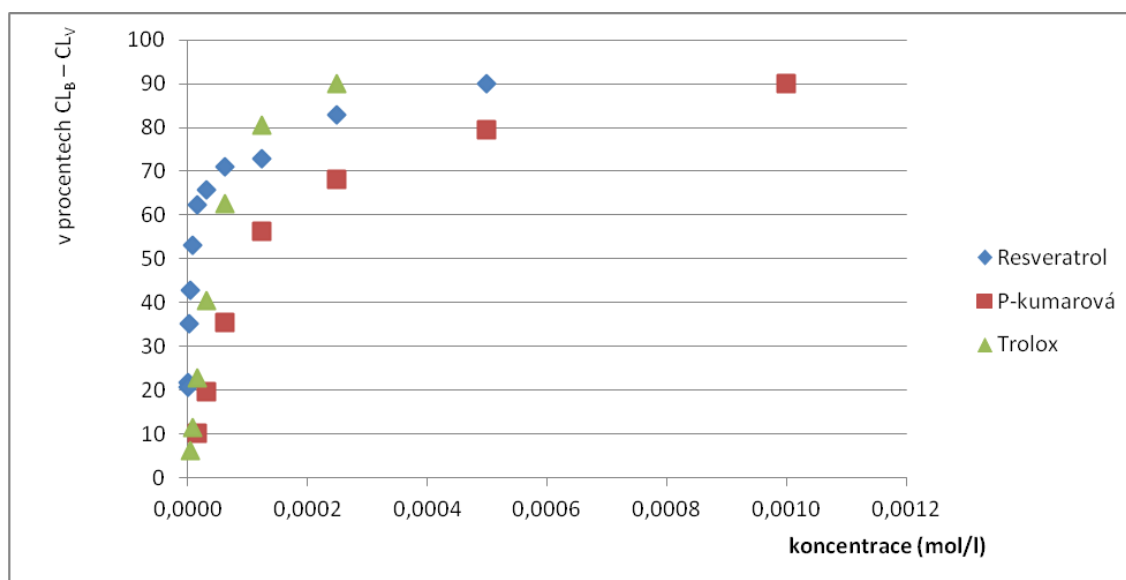
Postupně byly upravovány podmínky měření a koncentrace činidel. Podmínky měření č. 1 byly tyto - roztok peroxidu vodíku o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, roztok luminolu o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l v roztoku hydroxidu sodného. Podmínky č. 2 se lišily v koncentraci peroxidu vodíku, ta byla  $10^{-4}$  mol/l. Podmínky měření č. 3 se lišily tím, že prostředím pro luminol byl roztok hydrogenuhličitanu sodného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l s úpravou pH na 10 pomocí roztoku hydroxidu sodného. Za podmínek č. 4 byl použit roztok luminolu v roztoku hydrogenuhličitanu sodného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l bez úpravy pH. A pro podmínky č. 5 byl použit jiný katalyzátor - hexakynoželezitan draselný o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l.

Byly testovány tři látky vykazující antioxidační aktivitu a to: resveratrol, kyselina p-kumarová a trolox.

Následující grafy a tabulky shrnují antioxidační aktivitu všech sledovaných antioxidantů - resveratrol, kyselina p-kumarová a trolox. Pro souhrnné grafy a tabulky byly vybrány jako nejvhodnější podmínky měření č. 2 a jednalo se o porovnání výšek signálů respektive o rozdíly průměrů (v procentech) získaných chemiluminiscenčních signálů při pozorování výšek signálů a to v závislosti na koncentraci použitého antioxidantu. Sílu antioxidantů porovnává Tabulka č. 28.

Tabulka č. 26 – Souhrn porovnání výšek signálů v závislosti na koncentraci použitého antioxidantu; rozdíl průměrů výšek ( $CL_B - CL_V$ ) v procentech

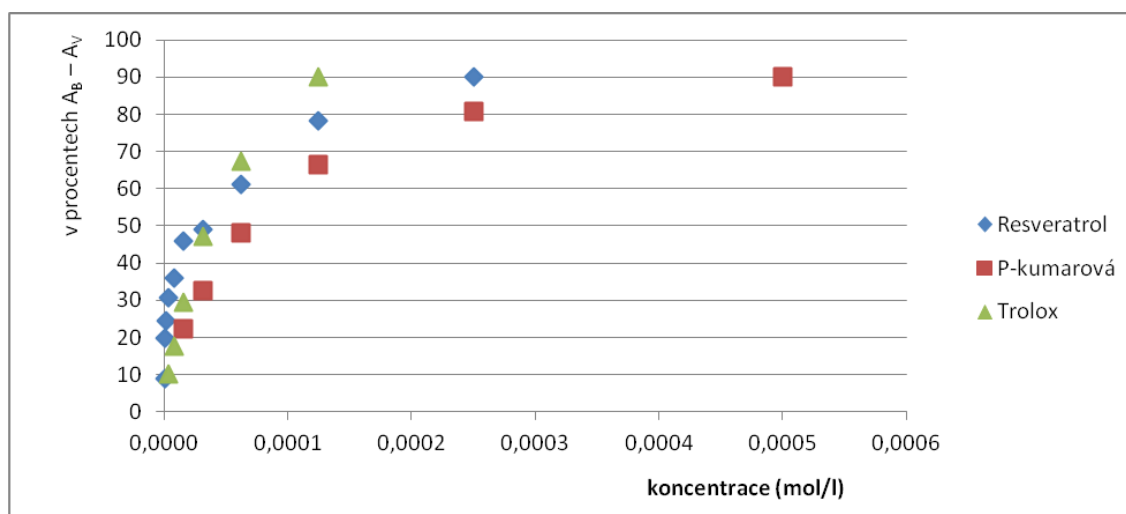
koncentrace (mol/l)	rozdíl $CL_B - CL_V$ vyjádřený v procentech		
	resveratrol	kyselina p-kumarová	trolox
0	0	0	0
$4,88 \times 10^{-07}$	21,63	0	0
$9,77 \times 10^{-07}$	20,74	0	0
$1,95 \times 10^{-06}$	35,07	0	0
$3,91 \times 10^{-06}$	42,80	0	6,20
$7,81 \times 10^{-06}$	53,08	0	11,42
$1,56 \times 10^{-05}$	62,36	10,24	22,81
$3,13 \times 10^{-05}$	65,78	19,75	40,50
$6,25 \times 10^{-05}$	71,00	35,50	62,58
$1,25 \times 10^{-04}$	72,92	56,24	80,52
$2,50 \times 10^{-04}$	82,88	68,24	90,00
$5,00 \times 10^{-04}$	90,00	79,36	
$1,00 \times 10^{-03}$		90,00	



Obr. č. 27 - Antioxidační aktivita resveratrolu, kyseliny p-kumarové a troloxu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí výšek signálů; na ose Y je uveden rozdíl  $CL_B - CL_V$  vyjádřený v procentech

Tabulka č. 27 – Souhrn porovnávající plochy signálů v závislosti na koncentraci použitého antioxidantu; rozdíl průměrů ploch pod píkem ( $A_B - A_V$ ), uvedených v procentech

koncentrace (mol/l)	rozdíl $A_B - A_V$ vyjádřený v procentech		
	resveratrol	kyselina p-kumarová	trolox
0	0	0	0
$4,88 \times 10^{-07}$	19,72	0	0
$9,77 \times 10^{-07}$	9,02	0	0
$1,95 \times 10^{-06}$	24,55	0	0
$3,91 \times 10^{-06}$	30,55	0	10,30
$7,81 \times 10^{-06}$	35,93	0	17,73
$1,56 \times 10^{-05}$	45,82	22,20	29,57
$3,13 \times 10^{-05}$	48,97	32,41	47,12
$6,25 \times 10^{-05}$	61,23	47,99	67,25
$1,25 \times 10^{-04}$	78,34	66,30	90,00
$2,50 \times 10^{-04}$	90,00	80,75	
$5,00 \times 10^{-04}$		90,00	



Obr. č. 28 - Antioxidační aktivita resveratrolu, kyseliny p-kumarové a troloxu za podmínek měření č. 2 znázorněná pomocí ploch pod píkem, respektive na ose Y je uveden rozdíl  $A_B - A_V$  vyjádřený v procentech



Pro porovnání antioxidační aktivity se často používá srovnání koncentrací testovaných látek, které způsobí 50% antioxidační aktivitu, v tomto případě zháší CL signál z 50%. Pro toto hodnocení nejsou použity přesně 50% účinnosti a to z toho důvodu, že přesná 50% účinnost nejde vypočítat přímou úměrou z naměřených hodnot. Jsou tedy použity ty hodnoty, které jsou naměřené během experimentů a blíží se svojí hodnotou 50%.

Zhášení 50% chemiluminiscenčního signálu za podmínek měření č. 2 (koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$  byla  $10^{-4}$  mol/l) proběhlo v těchto následujících koncentracích:

Tabulka č. 28 – Srovnání koncentrací testovaných látek s 50% antioxidační aktivitou

antioxidant	koncentrace při měření výšek	koncentrace při měření ploch
kys. p-kumarová	$1,25 \times 10^{-04}$ mol/l	$6,25 \times 10^{-05}$ mol/l
Resveratrol	$7,81 \times 10^{-06}$ mol/l	$3,13 \times 10^{-05}$ mol/l
Trolox	$6,25 \times 10^{-05}$ mol/l	$3,13 \times 10^{-05}$ mol/l

Rozdíly v koncentracích v případě hodnocení zhášení CL signálu pomocí výšek a při měření ploch se od sebe lišily jedním řádem, nicméně pořadí látek při porovnání jejich antioxidační aktivity zůstává podobné. Při hodnocení výšky CL signálu se jako nejsilnější antioxidant (působící v nejnižší koncentraci) projevil resveratrol, poté následuje trolox a jako nejslabší antioxidant byla vyhodnocena kyselina kumarová. Při hodnocení plochy CL signálu jsou resveratrol s troloxem stejně účinné, kyselina kumarová je opět mírně slabším antioxidantem.

## 6. ZÁVĚR

Cílem teoretické části byl popis funkce antioxidantů, popis metody SIA a především zhodnocení dalších existujících metod pro stanovení antioxidantní aktivity. Zdrojem informací byly odborné publikace jak v českém jazyce, tak literatura zahraniční.

Pro hodnocení síly antioxidantní aktivity pomocí chemiluminiscence je velmi výhodné použití systému SIA. SIA metoda je jednoduchá na programování kroků měření, s jednoduchou obsluhou, vyžaduje k měření jen velmi malé objemy činidel a především je určena pro měření velkého počtu vzorků v krátké době.

Pro experimentální část byly určeny modelové podmínky měření a to: zásobní roztok peroxid vodíku o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l, zásobní roztok luminolu o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l v roztoku hydroxidu sodného. Byly vyhledány nejvhodnější podmínky pro hodnocení antioxidantní aktivity - podmínky č. 2, kde oproti podmínkám č. 1 byla koncentrace peroxidu vodíku nastavena na  $10^{-4}$  mol/l. Byla porovnávána síla použitých antioxidantů, kdy nejsilnějším antioxidantem byl resveratrol, druhým v pořadí byl trolox a nejslabším antioxidantem byla kyselina p-kumarová. Kyselina p-kumarová vykazovala 50% antioxidantní aktivitu při koncentraci  $1,25 \times 10^{-4}$  mol/l ( $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l). Koncentrace resveratrolu použitá ke zhášení 50% chemiluminiscenčního signálu byla  $7,81 \times 10^{-6}$  mol/l ( $3,13 \times 10^{-5}$  mol/l) a u troloxu postačovala koncentrace  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/l ( $3,13 \times 10^{-5}$  mol/l), jsou uvedeny hodnoty získané při odečítání výšky píku, v závorce jsou hodnoty získané při odečítání ploch.

## POUŽITÁ LITERATURA

<sup>1</sup>H. Paseková, M. Polášek a P. Solich. Sekvenční injekční analýza. Sekvenční injekční analýza [online]. Chemické Listy 93, 1999, 354-359. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_06\\_354-359.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/1999_06_354-359.pdf) (únor 2015)

<sup>2</sup>M. Fidler a L. Kolářová. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. Chemické listy 103, 2009, 232-235. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_03\\_232-235.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_03_232-235.pdf) (únor 2015)

<sup>3</sup>H. Paulová, H. Bochořáková a E. Táborská. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chemické listy 98, 2004, 174-179. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_04\\_03.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf) (březen 2015)

<sup>4</sup>R. Yu and H. E. Schellhorn. Recent Applications of Engineered Animal Antioxidant Deficiency Models in Human Nutrition and Chronic Disease. Journal Nutrition 143, 2013, 1-11. Dostupné z: <http://web.a.ebscohost.com.ezproxy.is.cuni.cz/ehost/detail/detail?sid=3d5480ea-ae7f-47c4-9090-e419a838beaa%40sessionmgr4003&vid=0&hid=4114&bdata=JkF1dGhUeXBIPWlwLHVpZCxlcmwmbGFuZzljcyZzaXRIPWVob3N0LWxpdmU%3d#db=mdc&AN=23173175> (březen 2015)

<sup>5</sup>R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek and K. Güçlü. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry 85, 2013, 957–998. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15> (březen 2015)

<sup>6</sup>D.M. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold and S.J. Locke. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. Febs Letters 187, 1985, 33-37. Dostupné z: [http://ac.els-cdn.com.ezproxy.is.cuni.cz/0014579385812084/1-s2.0-0014579385812084-main.pdf?\\_tid=ddfff74c-cfaf-11e4-bc51-00000aab0f01&acdnat=1426931677\\_d9414628f317654fb5786a2f71e239c6](http://ac.els-cdn.com.ezproxy.is.cuni.cz/0014579385812084/1-s2.0-0014579385812084-main.pdf?_tid=ddfff74c-cfaf-11e4-bc51-00000aab0f01&acdnat=1426931677_d9414628f317654fb5786a2f71e239c6) (březen 2015)

<sup>7</sup>K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm and R. Bitch. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. Free Radical Research 36, 2002, 177–187. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11999386> (březen 2015)

- <sup>8</sup>M. Karabín, P. Dostálek a P. Hofta. Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity pivovarství. *Chemické listy* 100, 2006, 184-189. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_03\\_184-189.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_03_184-189.pdf) (únor 2015)
- <sup>9</sup>D. B. Haytowitz and S. Bhagwat. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. Nutrient Data Laboratory Beltsville Human Nutrition Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture. 2010. Dostupné z: [http://www.orac-info-portal.de/download/ORAC\\_R2.pdf](http://www.orac-info-portal.de/download/ORAC_R2.pdf) (březen 2015)
- <sup>10</sup>M. García-Padial, M. C. Martínez-Ohárriz, I. Navarro-Blasco and A. Zornoza. The Role of Cyclodextrins in ORAC-Fluorescence Assays. Antioxidant Capacity of Tyrosol and Caffeic Acid with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *Food Chemistry* 61, 2013, 12260–12264. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.is.cuni.cz/doi/abs/10.1021/jf403265b> (březen 2015)
- <sup>11</sup>A. Zulueta, M. J. Esteve and A. Frígola. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114, 2009, 310–316. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S0308814608011047> (březen 2015)
- <sup>12</sup>R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek and S. E. Çelik. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta* 160, 2008, 413–419. Dostupné z: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/detail/detail?sid=2d25c6c9-1425-4858-9790-73afb12d16d5%40sessionmgr115&vid=0&hid=115&bdata=Jmxhbm9Y3Mmc2l0ZT11aG9zdC1saXZl#db=a9h&AN=31474420> (březen 2015)
- <sup>13</sup>V. Kubištová. Diplomová práce – Studium antioxidační aktivity vína, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie. Olomouc 2012
- <sup>14</sup>Úloha č. 15 Stanovení antiradikálové aktivity metodou DPPH. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~dolezala/LRMCHP/%C3%9Aloha%20%C4%8D.%206%20LabRM%20-%20DPPH.pdf> (únor 2015)
- <sup>15</sup>M. Terashima, R. Watanabe, M. Ueki and S. Matsumura. Comprehensive evaluation of antioxidant activity for various substances with 5-axe cobweb chart. *Food Chemistry* 120, 2010, 150–155. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609011741> (březen 2015)

- <sup>16</sup>M. Polášek, P. Skála, L. Opletal, L. Jahodář. Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* 379, 2004, 754–758.
- <sup>17</sup>I. F. F. Benzie and J. J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“ the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 1996, 70-76. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796902924> (březen 2015)
- <sup>18</sup>U. B. Jagtap and V. A. Bapat. Antioxidant activities of various solvent extracts of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruit pulp. *Nutrafoods* 11, 2012, 137-144. Dostupné z: <http://link.springer.com.ezproxy.is.cuni.cz/article/10.1007/s13749-012-0053-8> (březen 2015)
- <sup>19</sup>X. Peng, Y. L. Xiong and B. Kong. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry* 113, 2009, 196–201. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S0308814608009175> (březen 2015)
- <sup>20</sup>Lumigen, A Backman Coulter Company, 2014. Dostupné z: <http://www.lumigen.com/detection-technologies/chemiluminescence> (březen 2015)
- <sup>21</sup>M. Kořínková. Diplomová práce – Studium vlivu chinonů a Quantum Dots částic na průběh chemiluminiscenčních reakcí, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK v Praze, Hradec Králové 2011
- <sup>22</sup>Stanovení antioxidační kapacity metodou fotochemiluminiscence na přístroji Photochem. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/ls-2013-2014/h3bl/index/h3bl-stanoveni-antioxidacni-kapacity-metodou-fotochemiluminiscence-ls-13-14.pdf> (březen 2015)
- <sup>23</sup>Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r5010?lang=en&region=CZ> (duben 2015)
- <sup>24</sup>Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9008?lang=en&region=CZ> (duben 2015)

<sup>25</sup>Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=en&region=CZ>

(duben 2015)